

THESIS

MUNICH

1964

Zur Biochemie der Ketonkörper-Entstehung

(Isocitratbestimmungen
in der ketotischen Rattenleber)

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

KARL-ADOLF WITTICH

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik

München

Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

ZUR BIOCHEMIE DER KETONKÖRPERENTSTEHUNG
(Isocitratbestimmungen in der ketotischen
Rattenleber)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-

Universität zu München

vorgelegt von

Karl-Adolf Wittich

München

1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. O. Wieland
Coreferent: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Prof. Dr. O. Hug
Tag der mündlichen Prüfung: 15. 12. 1964

INHALT

<u>Einleitung</u>	1
<u>Ergebnisse</u>	6
Bestimmung von Citrat und Isocitrat in der normalen Rattenleber	6
Einfluß der Entnahmetechnik auf den Iso- citratgehalt der Leber	9
Bestimmung von Isocitrat beim Langzeit- Diabetes und Hunger	11
Bestimmung von Isocitrat beim akuten Diabetes unter gleichzeitigen Cortisongaben	12
Bestimmung von Isocitrat bei ali- mentärer Ketose	14
<u>Diskussion</u>	19
<u>Experimenteller Teil</u>	35
Versuchstiere und Ketoseerzeugung	35
Organentnahme und Extrakterstellung	36
Colorimetrische Bestimmung von Citronensäure	38
Bestimmung von Isocitronensäure	42
Reagentien	44
Durchführung der Bestimmung	48
Eichkurve	52
Wiederfindversuche	54
Störmöglichkeiten	55
Spezifität der Bestimmung	55
Darstellung der 6-P-Gluconatde- hydrogenase	57

<u>Versuche zur experimentellen Diabeteserzeugung:</u>	60
<u>Statistische Berechnung</u>	66
<u>Zusammenfassung</u>	67
<u>Literatur</u>	70

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

AcAc	= Acetacetat
Ac-CoA, Acetyl-CoA	= Acetyl-Coenzym A
ADP	= Adenosin-5-diphosphat
ADTA	= Äthylendiamintetraacetat
AMP	= Adenosin-5-phosphat
ATP	= Adenosin-5-triphosphat
CoA, CoA-SH	= Coenzym A
CSC	= Citronensäurecyclus
EE	= Enzymeinheiten
FAD	= Flavinadenindinucleotid
GLDH	= Glutaminsäuredehydrogenase
G-6-P	= Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	= Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GSSGR, GR	= Glutathionreductase
GSH	= Glutathion, reduziert
GSSG	= Glutathion, oxydiert
HMG-CoA	= β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A

IC	= Isocitrat
IDH	= Isocitratdehydrogenase
α KG	= α -Ketoglutarat
3-Keto-6-PG	= 3-Keto-6-Phosphogluconat
μ M, μ Mol	= Mikromol = 10^{-6} Mol
nM, nMol	= Nanomol = 10^{-9} Mol
pM, pMol	= Pikomol = 10^{-12} Mol
NAD	= Nicotinamid-adenin- dinucleotid
NADH	= NAD, reduziert
NADP	= Nicotinamid-adenin- dinucleotid-phosphat
NADPH	= NADP, reduziert
PCS	= Perchlorsäure
6-P-GS	= 6-Phosphogluconsäure
6-P-GDH	= 6-Phosphogluconsäure- dehydrogenase
TCE	= Trichloressigsäure
Tris-HCL-Puffer	= Pufferlösung aus Tris- hydroxymethylaminomethan und Salzsäure

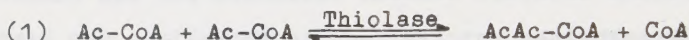


Digitized by the Internet Archive
in 2026

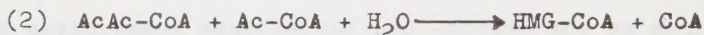
Mit der Entdeckung des Insulins im Jahre 1921 durch Banting und Best wurde die Zuckerkrankheit einer ätiologischen Behandlung zugeführt. Trotzdem treten heute bei 60-90 % der Patienten Komplikationen, besonders Spätkomplikationen auf (56). Als Ursache nimmt man neben einer acidotischen Stoffwechsellaage, einer gesteigerten hormonellen Gegenregulation u.a. auch eine Störung im Lipidstoffwechsel an. Das letztere scheint besonders für die diabetischen Gefäßkrankheiten zuzutreffen. Die Mortalität des Diabetes durch Koronarsklerose, Hypertonie, Glomerulosklerose und Gangrän beträgt 60 % verglichen mit der Sterblichkeit von 1,2 % an den Folgen des diabetischen Komas (56).

Beim Coma diabeticum treten vermehrt Ketosäuren auf, wodurch es zur Gewebs- und Blutacidose kommt. Diese Ketosäuren werden aus aktivierter Essigsäure, dem Acetyl-CoA, synthetisiert. Acetyl-CoA nimmt eine zentrale Stellung im Stoffwechsel ein. Es ist Sammelbecken der beim Kohlenhydrat- und Fettsäureabbau (87,127,81) anfallenden C_2 -Bruchstücke. Weiterhin ist es Ausgangspunkt der Cholesterinsynthese (11,12) und der Ketonkörperbildung. Vermehrte Acetessigsäureproduktion und damit β -Oxybuttersäure- und Acetonbildung läßt sich im Tierexperiment im wesentlichen durch vier Eingriffe erreichen: 1. durch Hungernlassen der Tiere, 2. durch reine Fettfütterung, 3. durch Erzeugen eines akut dekompensierten Diabetes mellitus und 4. durch Gabe von Corticosteroidhormonen mit dia-

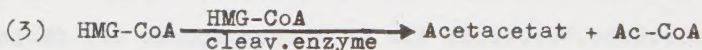
betogener Wirkung. In der Leber, dem für die Ketonkörperbildung ausschlaggebenden Organ, erfolgt die enzymatische Acetessigsäuresynthese nach dem von F. Lynen und Mitarb. 1958 entdeckten sogenannten HMG-CoA-Cyclus. Die erste Reaktion ist eine Umkehrung der Thiolyse bei der β -Oxydation. An dem Enzym β -Ketothiolase setzen sich zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA um (87). (Gl.1):



Das entstehende Acetacetyl-CoA wird mit einem neuen Molekül Acetyl-CoA zu β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA kondensiert (88). (Gl.2):



Die Freisetzung der Acetessigsäure erfolgt an dem "HMG-CoA cleavage enzyme" unter Rückbildung von Acetyl-CoA. (Gl.3):



Das "HMG-CoA cleavage enzyme" (Desmolase) wurde unabhängig von Coon (26, 5, 27) beim Studium des Isovaleriansäureabbaues entdeckt. β -Hydroxyisovaleriansäure ist ein Zwischenprodukt beim Abbau der Aminosäure Leucin und geht in mehreren Reaktionen schließlich in HMG-CoA über (5, 68, 69, 89).

Über die Stufe des HMG-CoA verläuft ferner die Chole-

sterinsynthese. Der erste Schritt ist die reduktive Bildung von Mevalonsäure in einer NADPH abhängigen Reaktion (37, 70).

Acetyl-CoA stellt weiterhin den Ausgangspunkt der Fettsäuresynthese dar. Die Synthese ist einmal in den Mitochondrien durch Umkehr der β -Oxydation möglich (125, 90). Ein anderer Weg, der im Cytoplasma der Zelle verwirklicht ist, führt über Malonyl-CoA (132, 91, 16, 133). Er dürfte für den Hauptanteil der biologischen Fettsäuresynthese maßgebend sein.

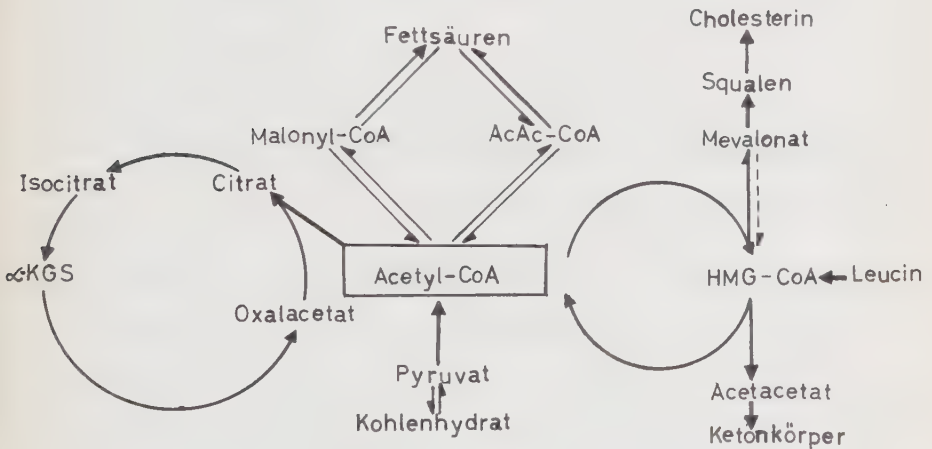
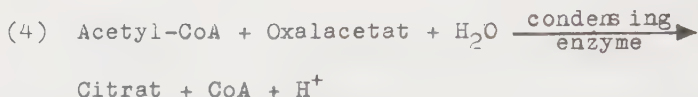


Abb.1: Hauptwege des Acetyl-CoA in der Leber

Für den Energiegewinn der Zelle von besonderer Bedeutung ist der Einstrom von Acetyl-CoA in den Citratcyclus.

Die aktivierte Essigsäure wird am "condensing enzyme" mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert (107, 128). (Gl.4):



Citrat wird weiter über cis-Aconitsäure zu Isocitrat isomerisiert. Martius und Leonhardt fanden, daß sich unter Einwirkung des Enzyms Aconitase in Leberextrakten ein Gleichgewicht von etwa 89 % Citrat und 8 % Isocitrat und 3 % cis-Aconitsäure einstellt.



Isocitrat wird im CSC weiter zu Oxalsuccinat oxydiert und Mn^{++} -abhängig zu α KGS decarboxyliert. Beide Reaktionen werden wahrscheinlich durch das gleiche Fermentprotein⁺⁾ katalysiert (100). (Gl. 6 u.7):



Obwohl das Gleichgewicht stark auf der Seite der α KGS liegt, ist eine Rückreaktion zum Isocitrat unter CO_2 -Fixierung bei günstigen Konzentrationsverhältnissen möglich (23).

Für Isocitrat ist bis heute kein anderer Entstehungsweg im Säugetierorganismus als der über Citrat bekannt. Selbst im Glyoxylsäurecyclus der Mikroorganismen (82:.)

⁺⁾ Im Citratcyclus wird Isocitrat an einer NAD^+ -abhängigen IDH oxydiert (71, 19, 112, 48)

entsteht es auf diese Weise. Aus Veränderungen des Isocitratspiegels sollten sich daher Rückschlüsse auf den Citratgehalt ziehen lassen.

Bestimmungen von Isocitrat bzw. Citrat in der Leber unter Ketosebedingungen erscheinen aus zwei Gründen interessant. Einmal ist bekannt, daß das Acetyl-CoA-Sammelbecken bei gesteigertem Fettsäureabbau in Richtung Ketonkörperbildung gleichsam überläuft (138, 147, 142, 50, 51). Man nimmt als Ursache an, daß Acetyl-CoA nicht in normalem Umfang in den Citratcyclus eintreten kann (142, 149, 21, 59), was sich an einem Absinken von Citrat und Isocitrat zeigen sollte.

Den Isocitratgehalt der Leber bei Ketose mit dem unter normalen Bedingungen vorhandenen zu vergleichen, würde demnach für dieses Problem sehr aufschlußreich sein. Weiterhin ist bekannt, daß bei Ketose die Fettsäuresynthese stark gehemmt ist (15, 31, 78, 79). In neuester Zeit hat man gefunden, daß Citrat oder Isocitrat die Aktivität der Acetylcarboxylase - das Enzym des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Fettsäuresynthese - steigert und ohne Anwesenheit dieser Tricarbonsäuren die Fettsäuresynthese gehemmt wird (106, 78, 17, 29). Es erscheint deshalb auch aus dieser Sicht die Isocitratbestimmung unter Ketoseverhältnissen bedeutungsvoll.

ERGEBNISSE

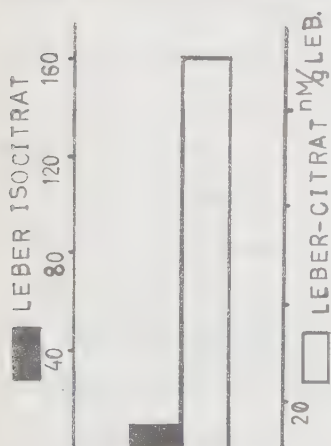
Gehalte der normalen Rattenleber an Isocitrat und Citrat.

Der Isocitratgehalt der Rattenleber ist schon unter physiologischen Bedingungen sehr gering und mit dem bekannten optischen Testverfahren nach O. Warburg (135) bei Verwendung der üblichen Photometer auf direktem Wege nicht exakt zu erfassen. Es wurde daher ein hochempfindlicher Isocitrat-Test entwickelt. Bei dieser Methode wird Isocitrat enzymatisch oxydiert (vgl. Reaktion Gl. [6]) und das stöchiometrisch anfallende NADPH in dem von Lowry (84a) angegebenen katalytischen NADP-Test bestimmt. Citrat wurde nach der colorimetrischen Methode von Natelson (98, 103) bestimmt. Allerdings kann diese Methode - vor allem unter Ketosebedingungen - nicht als ausreichend spezifisch angesehen werden. Die Citratwerte sind aus diesem Grunde bei Ketosen nicht mit Sicherheit verwertbar. Acetacetat im Blut der Versuchstiere wurde nach Walker (134) bestimmt. Der Acetacetatgehalt im Blut liegt bei Normaltieren um 0,2 mg% (138). Die Blutzuckerbestimmungen erfolgten ebenfalls mit einer colorimetrischen Methode (104).

Der hier verwendete Begriff "Metabolitgehalt" sei im Sinne Büchers (58, 21) verstanden. Er läßt lediglich eine Aussage über die im Frischgewicht eines

Gewebes vorhandene Gesamtmenge eines Metaboliten ("Komponente der normalen Sequenz der Stoffwechselreaktionen" 38,139) zu. Er sagt nichts über die Verteilung des Metaboliten in den verschiedenen Zelltypen, den Blutgefäßen und den interstitiellen Räumen des Gewebes aus. Unberücksichtigt bleibt ferner die Verteilung des Metaboliten in den einzelnen Räumen der Zelle selbst und die dort wirksamen Lösungskonzentrationen.

Zur Bestimmung des Isocitratgehaltes in der normalen Rattenleber wurden zwei Tierkollektive von männlichen Albinoratten untersucht. Die eine Gruppe von 15 Tieren wog im Durchschnitt etwas weniger als 300 Gramm, während die anderen 10 Tiere jünger waren und ca. 150 Gramm wogen. Die Mittelwerte von 8,9 und 7,6 nM pro Gramm Frischleber unterscheiden sich nicht wesentlich



von einander.

Bei 5 anderen Tieren wurde Citrat in der Leber bestimmt. Auf den Citrat-Mittelwert von 162 nM pro Gramm Frischleber bezogen beträgt der Isocitratgehalt der Rattenleber ca. 5% (vgl. Tab.1). Auf Grund der großen Streuung ist dieser Wert jedoch nur annäherungsweise verwertbar.

Abb.2: VERGLEICH DES ISOCITRAT- UND CITRATGEHALTES DER RATTENLEBER.

Tab.1: DER GEHALT DER RATTENLEBER AN ISOCITRAT
UND CITRAT. Isocitrat- und Citratwerte
sind in nM pro Gramm Frischgewicht, das
Tiergewicht in Gramm angegeben.

Gruppe I		Gruppe II		Citrat
Isocitrat	Gewicht	Isocitrat	Gewicht	
9,6	297	7,1	153	188
7,8	246	4,5	149	205
5,3	342	9,6	156	139
8,2	257	11,5	148	123
5,0	262	7,9	159	157
11,1	288	7,1	155	
12,6	273	9,7	144	
8,9	263	5,9	153	
7,6	328	5,6	157	
16,3	283	7,3	155	
9,2	343			
14,2	305			
5,4	248			
5,7	280			
6,4	261			
M: 8,9	285	7,6	153	162
s: 3,37		2,13		22,2

Der Einfluß der Entnahmetechnik auf den Isocitratgehalt der Leber.

Um den Einfluß der Entnahmetechnik bei der Gewinnung der Leberstücke auf den Isocitratgehalt festzustellen, wurden bei zwei Tieren in Äthernarkose je drei Leberproben entnommen. Das erste Leberstück wurde wie bei allen Versuchen im Gefrierstopp (58) gewonnen. Die zweite Leberprobe wurde entnommen, indem den Tieren ein Leberlappen mit der Schere abgeschnitten und innerhalb weniger Sekunden in flüssige Luft geworfen wurde. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert und drei Minuten danach ein noch unverletzter Leberlappen in flüssige Luft geworfen.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, stieg bei der zweiten Entnahme der Isocitratwert in beiden Lebern etwas an. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Leber nach dem Abschneiden mit der Schere Blut verlor und dadurch pro Gewichtseinheit mehr Leberparenchym erfasst wurde. Um einen Vergleich zu ermöglichen sei die Angabe dieses Anstieges mit 10% erlaubt. Bücher (58) fand nämlich bei einer Berechnung des Isocitratgehaltes in der Rattenleber unter Berücksichtigung des Blutanteiles ebenfalls einen Anstieg um ca. 10% in bezug auf den nicht korrigierten Wert.

Bei der dritten Entnahmetechnik, bei der die Leber

vor dem Gefrieren in Anoxie geriet, sank der Isocitratgehalt auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes ab.

Tab.2: DAS VERHALTEN VON ISOCITRAT BEI UNTERSCHIEDLICHER ENTNAHMETECHNIK DER LEBER.

Entnahme- technik	Gefrierstopp	Scherenschnitt	Scherenschnitt 3'n.Tötung
1.Tier	9,7	10,6	4,7
2.Tier	7,1	7,9	2,8

Die Zahlenwerte der Tabelle geben den Isocitratgehalt in nM pro Gramm Frischleber an.

Bestimmung von Isocitrat beim Langzeit-Diabetes
und bei Hunger.

Weder beim chronischen Diabetes noch im 24 stündigen Hungerzustand ließ sich eine statistisch signifikante Veränderung des Isocitratgehaltes gegenüber den Normalwerten in der Rattenleber feststellen (s. Tabelle 3). Die Langzeit-Diabetestiere hatten einen Alloxan-Diabetes von 9 Wochen Dauer. Die Acetacetatkonzentrationen im Blut der Hunger- und Diabetestiere lagen zwei Stunden vor den Isocitratbestimmungen durchweg unter 1 mg%.

Tab. 3: DER ISOCITRATGEHALT DER RATTENLEBER BEI
LANGZEIT-DIABETES UND HUNGER (24 STUNDEN)

Normal	Langzeit-Diabetes		Hunger
Isocitrat	Isocitrat	Blutzucker	Isocitrat
Einzel- werte der 25 Tiere von S.	8,2	485	6,8
	10,5	419	8,3
	10,1	428	8,7
	8,4	319	9,1
	7,6	473	6,2
	9,5	386	
M: 8,4	9,1	418	7,8
s: 2,96	1,1		1,32
Differenz: +8% ^{a)}			-7% ^{b)}

Legende zu Tab. 3: Isocitrat ist in nM pro Gramm Frischleber angegeben. Blutzuckerwerte in mg pro 100 ml Blut zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere. a) und b): mit einer Wahrscheinlichkeit P (s.S.66) = 0,25 und 0,32 unterscheiden sich die beiden Reihen nicht signifikant von den Normalwerten.

Bestimmung von Isocitrat beim akuten Diabetes unter gleichzeitigen Cortisongaben.

Da sich bei geringen Ketosen keine Veränderungen des Isocitratgehaltes der Leber feststellen ließen, wurden Versuche unternommen, um Isocitrat bei stärker ausgeprägten Ketosen zu bestimmen. Mit Insulin behandelte alloxandiabetische Ratten wurden durch Absetzen des Insulins und gleichzeitige Cortisongaben in einen schweren Ketosezustand gebracht. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, zeigte der Isocitratgehalt der Leber keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Normalwerten.

Legende zu Tabelle 4, Seite 13:

Die Isocitratwerte wurden in nM pro Gramm Frischleber, Acetacetat in mg pro 100 ml Blut angegeben.

a) 1x100 µg Dexamethason wenige Stunden vor Tötung der Tiere.

b) 1x100 µg Dexamethason wenige Stunden und 1x1 mg Scherisolon 24 Stunden vor Tötung.

c) 1x100 µg Dexamethason 48 Stunden und
1x1 mg Scherisolon 24 Stunden vor Tötung.

Tab. 4: DAS VERHALTEN VON ISOCITRAT IN DER RATTEN-
LEBER BEIM AKUTEN DIABETES UNTER GLEICH-
ZEITIGEN CORTISONGABEN.⁺

Normal Isocitrat	akut diabetisch ⁺	
	Isocitrat	Acetacetat
Einzelwerte der 25 Tiere von Seite 8	8,7	15,3 a)
	10,2	40,1)
	11,9	9,0 b)
	8,3	25,4)
	4,3	25,4 c)
	12,4	6,2)
	7,4	5,5)
	11,6	7,6)
M: 8,4	9,35	16,8
s: 2,96	2,72	
Differenz:	+11%	

⁺Herrn Dr. G.Löffler, Homburg/Saarland habe ich für die
Überlassung von Lebergewebe dieser Tiere zu danken.

Der Isocitratgehalt der Leber bei alimentärer
Ketose.

In den folgenden Experimenten wurden schwere Ketosen dadurch erzeugt, daß normale Ratten ausschließlich eine Fettdiät erhielten. Die Tiere entwickelten nach verschieden langer Dauer stärkste Blutketosen. Die Bestimmung von Isocitrat ergab eine starke Verminderung dieses Substrates in der Leber. Da die Werte jedoch nicht unerheblich streuten, wurde eine Serie von je zwei Bestimmungen am selben Tier durchgeführt. Zunächst wurde den narkotisierten Tieren ein Leberstück im Gefrierstopp entnommen und sie anschließend operativ versorgt. Daraufhin erhielten sie einige Tage normale Diät, um die Rückbildung der Operationsfolgen sicherzustellen. Dann bekamen 12 Tiere eine Fettdiät (bestehend aus geräuchertem Schweinespeck), während 3 Tiere weiterhin normales Futter erhielten. Die folgenden Isocitratbestimmungen zeigten bei den Ketosetieren ausnahmslos ein Absinken des Isocitrates auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes (vgl. Tab. 5). Diese Veränderung ist statistisch signifikant ($P < 0,01$).

Die Bestimmungen bei den 3 Kontrolltieren zeigen, daß die Leberentnahme allein keinen Einfluß auf den Isocitratgehalt ausübt.

Tab.5: DAS VERHALTEN VON ISOCITRAT IN DER RATTEN-
LEBER VOR UND NACH SPECKFÜTTERUNG AM SELBEN
TIER.

Tier Nr.	1. Leberentnahme (Ausgangswert)	Speck- futter (Stunden)	2. Leberentnahme (bei Tötung)	
	Isocitrat		Isocitrat	Acetacetat
1	8,2	96	3,6	14,3
2	5,0	"	3,5	7,9
3	11,1	70	6,1	11,2
4	12,6	"	8,4	1,5
5	8,9	80	6,9	11,6
6	7,6	"	5,4	19,4
7	16,3	118	8,2	5,3
8	9,2	"	3,0	18,4
9	14,2	"	6,0	6,7
10	5,4	85	2,2	7,8
11	5,7	"	3,0	13,7
12	6,4	"	3,4	10,8
	M: 9,66		4,97	10,5
	s: 2,98		2,13	
	Differenz		-48,5%	

Legende zu den Tabellen 5 und 6: Bei den Tieren handelt es sich um die schon früher aufgeführten 15 Ratten der Tab. 1, Seite . Der Isocitratgehalt ist in nM pro Gramm Frischleber, Acetacetat in mg pro 100ml Blut angegeben.

In Tab.6, die die Ergebnisse von Blindversuchen wiedergibt, ist der Zeitabstand der beiden Leberentnahmen derselbe wie bei den Ketosetieren.

Tab.6: DAS VERHALTEN DES ISOCITRATES DER LEBER NACH VORAUSGEHENDER TEILHEPATEKTOMIE AM SELBEN TIER.

TierNr.	1. Leberentnahme	Normal- diät	2. Leberentnahme
	Isocitrat		Isocitrat
13	9,6	"	11,9
14	7,8	"	8,1
15	5,3	"	7,2
	M: 7,6		9,1

Bei einer ausgesuchten Gruppe von schwer ketotischen Tieren mit Blut-AcAcspiegeln über 15 mg% (Mittelwert 20,3 mg%) fand sich eine noch stärkere Verringerung von Isocitrat der Leber als in den vorausgehenden Versuchen (vgl. Tab.7). Bezogen auf die Werte von 10 Normaltieren (von gleichem Alter, Gewicht, Geschlecht und zeitlich zu den Ketosetieren parallel gehenden Bestimmungen), ergab sich hier eine Reduktion des Isocitratgehaltes um annähernd 75%. Das Verhalten des Isocitrates in Abhängigkeit von der Schwere der Blutketose ist in Abb.3 wiedergegeben.

Tab.7: DAS VERHALTEN VON ISOCITRAT IN DER RATTEN-
LEBER BEI ALIMENTÄRER KETOSE.

Normal Isocitrat	Alimentäre Ketose	
	Isocitrat	Acetacetat
7,1	1,39	15,7
4,5	0,83	19,5
9,6	0,65	19,0
11,5	3,20	24,2
7,9	2,70	30,2
7,1	1,90	19,1
9,7	1,76	16,4
5,9	1,84	19,4
5,6	1,12	15,2
7,3	4,0	24,7
M: 7,6	1,94	20,3
s: 2,13	1,07	
Differenz :	- 74,5%	

Legende zu Tabelle 7: Die Isocitratwerte geben den Gehalt in nM pro Gramm Frischleber an. Acetacetat ist in mg pro 100 ml Blut angegeben. Die Kontrolltiere sind die gleichen wie in Tab.1, Gruppe 2. Die schweren Ketosen wurden erzeugt, indem die Tiere zunächst 48 Stunden hungerten und anschließend 72 Stunden lang ausschließlich geräucherten Schweinespeck zu fressen

bekamen.

Die Ergebnisse der letzten Versuche sind in Abb.3 zusammengefaßt.

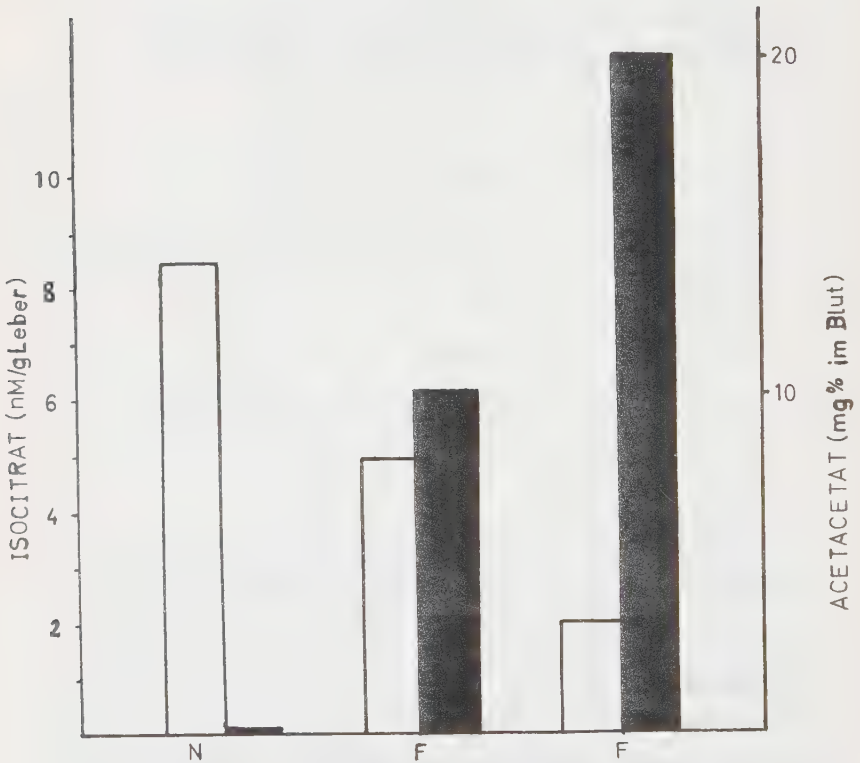


Abb.3: VERGLEICH ZWISCHEN ACETACETAT IM BLUT UND LEBER-ISOCITRAT BEI ALIMENTÄRER KETOSE.

Erläuterung zur Abb.3: Die weißen Säulen geben den Isocitratgehalt in der Leber, die schwarzen das Acetylacetyl im Blut an. N=normal, F=Fettketose.

DISKUSSION

Bei der Energiegewinnung stehen der Zelle neben Eiweiß Kohlenhydrate und Fette zur Verfügung. Wird die Kohlenhydratverbrennung beeinträchtigt, wie dies beim Diabetes, im Hungerzustand und bei reiner Fetternährung der Fall ist, so gewinnt der Organismus seine Energie vornehmlich aus der Fettsäureoxydation (9, 50, 80, 124). Hierbei kommt es in der Leber auf dem Weg über Acetyl-CoA zu einer mehr oder weniger starken Ketonkörperbildung. Ursachen und Mechanismen dieser Vorgänge waren lange Zeit unverständlich. Die am häufigsten vertretene Theorie der Ketoseentstehung besagt, daß Acetyl-CoA infolge ungenügender Oxalacetatkonzentrationen in der Leber nicht in den CSC eintreten kann und deshalb in AcAc umgewandelt wird. Andererseits ließen sich zunächst beim Diabetes keine Beweise für diese Oxalacetat-Mangeltheorie (81, 141, 18, 41, 75, 82) erbringen. Kalnitzki, Shaw, Tapley (64, 126) und ferner Löffler (84) fanden in der Leber chronisch alloxandiabetischer Ratten keine Veränderung von Oxalacetat. In diesen Versuchen war der Ketosegrad jedoch relativ gering und entspricht ungefähr den Ketosen bei chronischem Diabetes und Hunger in der vorliegenden Arbeit. Wie die vorliegenden Versuche zeigen, fanden sich hierbei auch keine Veränderungen des Isocitratgehaltes der Leber.

Auf der anderen Seite wurde sogar über eine Beschleu-

nigung des CSC beim Diabetes berichtet. So ergab z.B. die Inkubation von Leberschnitten diabetischer Tiere mit C^{14} -Acetat eine leicht gesteigerte $C^{14}O_2$ Bildung im Vergleich zu normalen Leberschnitten (36, 61, 33, 34, 152). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß es sich ebenfalls um Tiere im chronischen Stadium des Alloxandiabetes handelte, bei denen keine höheren Ketosegrade vorliegen konnten.

Eine Verminderung der Zwischenprodukte des CSC fanden Frohman und Orten (44, 45) in der Leber chronisch alloxandiabetischer Ratten. Diese Arbeit enthält jedoch keine Angaben über den Ketosegrad der Tiere. Die dort gefundenen Werte von 5-10 nM Isocitrat pro Gramm Frischleber liegen im Bereich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Normalwerte ⁺). Andere Autoren (77) berichten neben einem Abfall von Aminosäuren von einer Verminderung einiger Substrate des Krebs-Cyclus im Blut alloxandiabetischer Kaninchen. Hier fand Rembiese (120) ein Absinken des Blutcitrats vom Normalwert 3,9 mg% auf 0,15 mg% bei einem Blutzucker von 413 mg%. Ähnliche Befunde wurden an diabetischen Patienten erhoben (119). Insulin senkt den

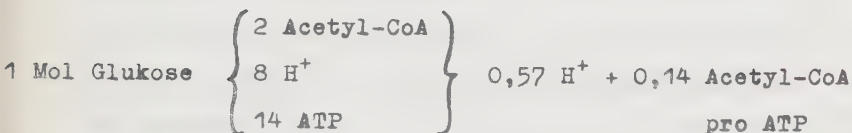
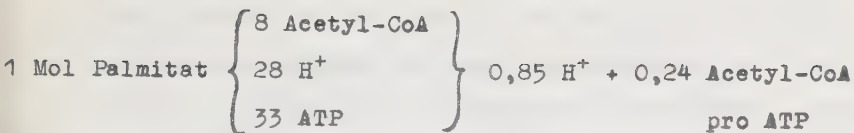
+) In der vorliegenden Arbeit wurde in der normalen Rattenleber ein mittlerer Isocitratgehalt von 8,4 nM/g Frischleber ermittelt. Dagegen fanden Frohman und Orten (44, 45) 45 nM und Hohorst u. Mitarb. (58) 21 nM/g Frischleber. Gründe für diese abweichenden Befunde sind nicht ersichtlich.

Citratspiegel im Blut normaler Kaninchen (111). In der normalen Rattenleber bewirken Insulingaben keine Veränderungen des Citrats (99). Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß Barbieri (6) ein Absinken des Citratgehaltes im Knorpel diabetischer Ratten fand.

Versucht man aus all diesen Untersuchungen Hinweise auf den Mechanismus der Ketonkörperentstehung zu ziehen, so muß grundsätzlich die Frage nach dem Stadium des Diabetes gestellt werden. So erscheint der chronische Alloxandibabetes der Ratte für das Studium der Ketogenese ein ungeeignetes Objekt, weil diesen Tieren die notwendige Voraussetzung für die Ketonkörperproduktion - d.h. ausreichende Vorräte an Körperfett - fehlt. Berücksichtigt man diesen Punkt, so läßt sich die ausgedehnte Literatur auf dem Gebiet der Ketogenese auf nur wenige Arbeiten reduzieren. Dies gilt vor allem auch für die anfangs schon angeschnittene Frage des Oxalacetatmangels als Ursache der vermehrten Acetessigsäurebildung. Im Gegensatz zu den Versuchen bei chronischem Alloxandibabetes (84, 148, 64, 126) fand sich nämlich bei akut dekompensierten Diabetesratten ein Abfall des Leberoxalacetats auf etwa die Hälfte des Normalwertes (142, 21, 59). O. Wieland und Mitarb. (142) stellten außerdem in Leberschnitten unter Ketoseverhältnissen eine Abnahme der C^{14} -acetatoxydation an Hand des gebildeten $C^{14}O_2$ fest. Kronfeld (76) fand beim ketotischen Schaf ein Absinken

von Oxalacetat. Dagegen berichten Tom propoulos und Kleiber (130), daß nach Injektion von C^{14} -Acetat an ketotische Rinder die spezifische Aktivität im Citrat und Atmungs- CO_2 stärker ist als bei Normaltieren; dies deutet auf eine Beschleunigung des CSC hin.

Mit Ausnahme der oben zitierten Arbeit (130) fanden demnach die meisten Autoren eine Hemmung des CSC unter Ketosebedingungen. Darauf und auf anderen Arbeiten beruhend, läßt sich folgendes Bild der Ketonkörperentstehung entwerfen (142). Ist der Organismus vorwiegend auf die Energiegewinnung aus Fett angewiesen, dann kommt es zunächst zu einer Mobilisierung der peripheren Fettreserven und zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut (50). In der Leber werden die Fettsäuren bevorzugt aufgenommen und oxydiert (51). Die Fettsäureoxydation führt nun zu grundsätzlich anderen Folgen als der Glukoseabbau. Bei der Oxydation von 1 Mol Palmitat gelangt der Organismus zu einer Energieausbeute von 33 Mol ATP bei einem Anfall von 8 Mol Acetyl-CoA. Damit werden pro Mol ATP 0,24 Mol Acetyl-CoA gebildet. Bei der Glukoseoxydation fallen pro Mol ATP jedoch nur 0,14 Mol Acetyl-CoA an. Bei der Fettsäureoxydation fällt demnach laut dieser Berechnung von F. Lynen (90, 143) die 1,7-fache Menge an Acetyl-CoA bei gleicher Energieausbeute gegenüber dem Glukoseabbau an.



Summe: Palmitat $\longrightarrow$ 1,7-fache Acetyl-CoA + 1,5-fache H^+ -Bildung pro ATP in Bezug auf Glukose.

Wie aus der obigen Zusammenstellung von O. Wieland (144) hervorgeht, ist eine weitere Folge dieser einseitigen Substratoxydation die 1,5-fache Bildung von Wasserstoff gegenüber dem Glukoseabbau. Experimentelle Hinweise für die Richtigkeit dieser Überlegungen konnten auch erbracht werden. So fand Klingenberg in Untersuchungen isolierter Mitochondrien einen Anstieg des in Form von NADH erscheinenden Wasserstoffs. Ähnliche Befunde wurden von O. Wieland und Mitarb. bei Fettbelastungsversuchen an der isolierten, durchströmten Rattenleber erhoben (145, 146). Die indirekte NADH-Messung an den Redoxpaaren Oxalacetat $\rightleftharpoons$ Malat, Pyruvat $\rightleftharpoons$ Lactat und Dihydroxyacetonphosphat $\rightleftharpoons$ Glycerophosphat ergab bei alloxandiatetischen und mit Fett gefütterten Tieren eindeutige Verschiebungen des Gleichgewichts zur reduzierten Seite hin (59, 76, 142). Der Aufstau des Wasser-

stoffs als NADH könnte evtl. damit erklärt werden, daß das bei der Fettsäureoxydation entstehende FADH bevorzugt vor NADH in der Atmungskette oxydiert wird. Als Alternative käme eine Umkehr der Atmungskettenphosphorylierung auf der Flavin-Stufe in Betracht. Der Anstieg des NADH wirkt sich besonders folgenreich an dem Redoxpaar Oxalacetat $\rightleftharpoons$ Malat aus. Durch den Zwang des NADH auf das Gleichgewicht zum Malat hin nimmt Oxalacetat ab und fehlt damit für die Primärreaktion im CSC mit Acetyl-CoA. Es kommt aus diesem Grund und wegen der gesteigerten Neubildung infolge der Fettsäureoxydation zu einem Anstieg des Acetyl-CoA, wie er auch in der stark ketotischen Rattenleber nachgewiesen wurde (138, 147). Ein Anstieg des Acetyl-CoA durch die Blockade des CSC ist demnach ein entscheidender Zwischenschritt bei der Ketonkörperentstehung. Die bei alloxandibetischen Tieren, jedoch nicht bei Hunger und Fettfütterung nachgewiesene Aktivitätssteigerung des Acetacetat-bildenden Enzymsystems (96, 148) spielt bei diesem Mechanismus offenbar nicht die entscheidende Rolle.

Durch die Arbeiten O. Wielands (149, 150, 151) und Tubbs' (131) ist bekannt geworden, daß noch ein anderer Mechanismus im Zusammenhang mit der Fettsäureoxydation die Citratkondensation beeinflußt. Nach diesen Autoren wird Citratsynthase aus Schweineherz und Rattenleber durch aktivierte Fettsäuren gehemmt. Besonders die langkettigen Acyl-CoA Verbindungen setzen die Affinität des

Oxalacetats zum Enzymprotein herab. Acyl-CoA Verbindungen sind unter Ketoseverhältnissen in der Leber vermehrt (bei Fettfütterung und Hunger nachgewiesen, 131a), und als Folge ihrer Oxydation ist Oxalacetat - wie eingangs diskutiert - vermindert. Da der Mechanismus der Acyl-CoA Hemmung einer Herabsetzung der Affinität der Citratsynthase gegenüber Oxalacetat gleichkommt, gewinnt das Absinken des Oxalacetats eine weitere regulatorische Bedeutung. Es scheint hier ein Kontrollmechanismus des CSC von erheblicher Wirksamkeit vorzuliegen, dem eine wichtige Rolle bei der Ketonkörperentstehung zukommt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fügen sich - mit einer Ausnahme - gut in dieses Bild der Ketonkörperentstehung ein. Beim chronischen Diabetes und Hunger blieb der Isocitratgehalt in der Leber unverändert, da entsprechend der geringen Ketose die Fettsäureoxydation nicht stark genug war, um die geschilderten Mechanismen auszulösen und den CSC zu blockieren. Wie schon erwähnt, besitzen die chronisch diabetischen Tiere keine größeren Fettreserven mehr und müssen die Energiegewinnung vornehmlich aus Eiweiß bestreiten. Dem entsprach auch die extreme Abmagerung der Tiere, als sie zum Versuch kamen. Der unveränderte Isocitratgehalt bei Hunger und chronischem Diabetes paßt gut zu den Befunden von O. Wieland und Mitarb. (84, 148), die Oxalacetat und Acetyl-CoA unter gleichen Bedingungen ebenfalls unverändert fanden.

Bei den vorliegenden Fettfütterungsversuchen kann die Isocitratverminderung, wie auch die Abhängigkeit der Verminderung vom Ketosegrad als eine weitere Stütze der geschilderten Anschauungen über die Ketonkörperentstehung angesehen werden. Bei 12 Ketosetieren mit einem mittleren Blutacetacetatspiegel von 10 mg% sank der Isocitratgehalt der Leber um -48,5 % ab gegenüber einem Kontrollwert, der aus 12 vorausgehenden Bestimmungen an denselben Tieren ermittelt wurde. Bei 10 Tieren mit stärker ausgebildeten Ketosen (mittlerer Blutacetacetatspiegel = 20 mg%) fand sich ein Absinken des Isocitrats sogar auf -74 %.

Ein unerwartetes Ergebnis brachten dagegen die Isocitratbestimmungen beim akuten Diabetes unter Cortisongaben. Der unveränderte Isocitratgehalt unter diesen Bedingungen läßt sich nicht ohne weiteres interpretieren. Da bei allen Diabetestieren Cortisonderivate vor den Isocitratbestimmungen gegeben wurden, ist ein Vergleich mit anderen Arbeiten (142, 21, 59), die eine Verringerung von Oxalacetat bei akutem Diabetes fanden, nicht sicher möglich. Beim Diabetes weicht der Eiweißstoffwechsel im Sinne kataboler Prozesse von der Norm ab. Aminosäuren werden durch Transaminierung verstärkt abgebaut. Nach den Untersuchungen von Th. Bücher und Mitarb. (66) nimmt in der diabetischen Rattenleber der Gehalt an Alanin, Asparagin und Glutamat ab. Es kommt nach einer Reihe von Autoren (110, 109, 30, 40, 117, 39)

zu erheblichen Aktivitätssteigerungen der Transaminasen beim Diabetes. Dadurch wird sowohl die Glukoneogenese als auch die Ketonkörperentstehung gefördert. Diese Prozesse dürften noch weit stärker aktiviert werden bei Gabe von Cortisonderivaten an Diabetestiere, wie es in der vorliegenden Arbeit geschah. Cortison, Hydrocortison, Prednisolon, Dexamethason bewirken Aktivitätssteigerungen der Transaminasen durch Enzyminduktion (116, 32, 122, 47, 129). Unter den Versuchsbedingungen des akuten Diabetes mit Cortisongaben ist daher eine verstärkte Acetessigsäurebildung aus ketoplastischen Aminosäuren, wie Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin denkbar. Der Abbau von Leucin zu HMG-CoA ist beim Diabetes begünstigt (4,72). So bewirkt Absetzen der Insulinbehandlung bei alloxandiabetischen Ratten ein Absinken des Leucineinbaus in die Proteine von Leberschnitten, der sich durch Insulin und Glucosegaben wieder steigern läßt (72, s.auch 72a). Die Tyrosintransaminase, ein Enzym des Abbauweges von Tyrosin zu AcAc, wird durch Corticosteroide in ihrer Aktivität gesteigert (116). Im Urin diabetischer Ratten wird nach Tyrosin-Verfütterung Homogentisinsäure - ein Zwischenprodukt des Abbauweges von Tyrosin zu AcAc - ausgeschieden (108a). Verfüttert man an hungernde oder alloxandiabetische Ratten Phenylalamin, Tyrosin und Leucin, so kommt es zu einer vermehrten Ketonkörperbildung (95a, s.auch 4, 5, 5a, 26). Nach Bachhawat (4a) können im diabetischen Organismus

aus 1 Mol Leucin 1,5 Mole Ketonkörper entstehen.

O. Wieland und L. Weiß fanden in einer Versuchsserie mit 10 akut diabetischen Rattenlebern, wovon 8 Tiere unter Cortisongaben standen, eine geringere Acetyl-CoA Erhöhung als bei Fettfütterungsketose (trotz einer 2,4-fachen Acetacetatkonzentration im Blut der Diabetestiere). Mit anderen Worten: trotz gleicher Ketosegrade zeigt die Leber bei akutem Diabetes mit Cortisol im Vergleich zur Fettfütterungsketose eine geringere Erhöhung des Acetyl-CoA. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte eine Ketonkörperbildung aus ketoplastischen Aminosäuren sein, die nicht über die Stufe des Acetyl-CoA verläuft.

	Acetyl-CoA	Acetacetat
Normal	19,9	0,1-0,2
Diabetes + Cortisol	46,9	21,4
Fettfütterung	58,1	8,7

Tabelle 8 (aus O.Wieland, 144)

Dann könnte das Gleichbleiben des Isocitratgehaltes beim akuten Diabetes unter Cortisongaben in dem Sinne aufgefaßt werden, daß der Ketosegrad unter diesen Bedingungen nicht mehr als ausschließlicher Indikator der Stärke der Fettsäureoxydation anzusehen ist. Es erscheint jedoch

zweifelhaft, daß Aminosäuren an der Ketonkörperbildung wesentlich beteiligt sind, nachdem viele Autoren (82a, 142) fanden, daß Ketose an das Vorhandensein ausreichender Fettvorräte geknüpft ist.

Für das Nichtabsinken des Isocitrates beim akuten Diabetes unter Cortisongaben könnten noch andere Faktoren eine Rolle spielen. In Rattenlebermitochondrien wurde eine NADP-abhängige und eine NAD-IDH nachgewiesen (48). Nach Ochoa (108) liegt das Gleichgewicht für die Oxydation und Decarboxylation des Isocitrates durch Herzmuskel NADP-IDH stark auf der Seite der gebildeten α KGS. Die Gleichgewichtskonstante lautet für pH = 7,1 und 22°C:

$$K = \frac{[\text{Isocitrat}] \cdot [\text{NADP}]}{[\text{KGS}] \cdot [\text{CO}_2] \cdot [\text{NADPH}]} = 1,3 \times 10^{-4}$$

Das Redoxpotential der Reaktion beträgt $E'_0 = -0,30$ V. Koppelt man ein System aus α KGS, CO_2 , Aconitase, IDH, Mn^{++} und eine NADPH liefernde Reaktion mit negativerem Redoxpotential (z.B. G-6-P, Zwischenferment und NADP, $E'_0 = -0,42$), so kommt es zur Bildung von Isocitrat. Durch das Vornandensein der Aconitase wird Isocitrat weitgehend dem Gleichgewicht entzogen und liegt in 8 % in bezug auf Citrat und cis-Aconitsäure vor.

In der akut diabetischen Rattenleber kommt es nach O. Wieland (144) weniger zu einem NADPH Anstieg als

vielmehr zur Anhäufung von NADH. Die Umkehrbarkeit der Reaktion an NAD-IDH wurde an einem Hefepräparat bewiesen (54). Die Gleichgewichtskonstante hat einen ähnlichen Wert wie bei der NADP abhängigen Reaktion. Für die Umkehrbarkeit dieser Reaktion wurden einige interessante Gesetzmäßigkeiten gefunden (54). Es kommt besonders im leicht sauren pH (Optimum pH 6,5) zur Isocitratbildung. Geringe Isocitrat- und Citratkonzentrationen begünstigen den Rücklauf. Eine starke Aktivitätssteigerung erfährt das Enzym durch AMP. Die Michaeliskonstanten betragen für Isocitrat $K_M = 0,1 \text{ mM}$ (bei AMP Sättigung) und $K_M = 0,5 \text{ mM}$ (ohne AMP). Bei der NAD-IDH aus Rinderherz (113) und Rattenleber (54) wird dagegen die Michaeliskonstante nicht durch AMP, sondern durch ADP gesenkt. Betrachtet man die Verhältnisse in der ketotischen Rattenleber, so ist zunächst eine Verschiebung des pH zum leicht Sauren wahrscheinlich. In den Mitochondrien alloxandiabetischer wie auch pankreatektomierter Katzen ist der P/O Quotient erniedrigt und ATP stark vermindert (53). In der Leber alloxandiabetischer Ratten sinkt ATP ebenfalls ab, und AMP ist vermehrt (10). Durch Insulingaben wird der ATP-Gehalt sowohl bei der Katze wie auch bei der Ratte auf normale Werte gebracht.

Es liegen demnach in der ketotischen Leber günstige Bedingungen für die Umkehrbarkeit der Isocitrat-oxydation, besonders am NAD abhängigen Enzym, vor. NADH fällt

bei Ketose in der Leber vermehrt an, während das zur Isocitratoxydation nötige NAD verringert ist. Eine wichtige Frage dieses Problems ist, ob zur Umkehr der Reaktion ausreichende α KGS Konzentrationen vorliegen. α KGS wird beim Abbau der Glutaminsäure und von Glutamin (95) gebildet. Durch Transaminierung werden dabei die Amino-
gruppen auf andere Ketosäuren übertragen. In Rattenleber-mitochondrien geht der Hauptweg des Glutamatabbaus über α KGS (52). Beim Diabetes kommt es zu einer verstärkten Neubildung dieser Säure. Die betreffenden Transaminasen GOT und GPT erfahren in der diabetischen Leber erhebliche Aktivitätssteigerungen (117, 30, 109, 110, 39). Glutaminsäure ist in der diabetischen Rattenleber vermindert (66). Durch Cortisonapplikation (und Dexamethason, 129) erfahren die GOT und GPT eine weitere Aktivitätssteigerung (116, 32, 122, 47, 109). α KGS dürfte demnach unter den speziellen Bedingungen eines akuten Diabetes mit gleichzeitigen Cortisongaben erheblich stärker gebildet werden als unter normalen Verhältnissen oder bei Fettfütterungsketose. Auch die Oxydation der vermehrt anfallenden α KGS in der irreversiblen Reaktion zu Succinat könnte gehemmt werden. Dafür ließe sich der NAD Mangel (142), eine Hemmung der α KGS Oxydation durch Alloxan (nachgewiesen in Nierenhomogenaten, 13) und durch Acetacetat anführen (Acetacetat hemmt den CSC zwischen Oxalacetat und Citrat und ferner zwischen α KGS und Succinat, 62). Die Möglichkeit der Umkehr der Isocitratoxyda-

tion und damit eine "Auffüllung eines leeren Substratbeckens" hinter der gehemmten Primärreaktion im CSC wurde neuerdings auch durch Isotopenexperimente mit Leberschnitten unterstrichen, in denen der Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in Glucose bei Anwesenheit von α -KGS und Malonat gelang (131b). Unter diesem Aspekt könnte der unveränderte Isocitratgehalt bei akutem Diabetes unter Cortisongaben mit den Befunden bei der Fettfütterungsketose und den bekannten Vorstellungen über die Ketonkörperentstehung in Einklang gebracht werden. Inwieweit eine der diskutierten Möglichkeiten, eine mäßige Fettsäureoxydation und Ketonkörperbildung aus Eiweiß oder eine Umkehr der Isocitrat-oxydation, für die Ergebnisse bei akutem Diabetes mit Cortisol zutreffen, kann nicht sicher entschieden werden. Unter Umständen erfuhren die Versuche durch die Cortisongaben eine entscheidende Beeinflussung. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang eine Arbeit (57), in der nach Hydrocortisongaben an Vögel ein Anstieg der Plasmacitronensäure beschrieben wird.

Nach Felts (36a) enthält das hier verwendete Rattenfutter (Altromin R) Citrat in größeren Mengen ($3,4 \mu\text{M/g}$ Futter). Damit könnte das Verhalten des Isocitrats beim akuten Diabetes am leichtesten erklärt werden. Die Diabetestiere könnten so ihren Isocitratspiegel aufrechterhalten, während die mit Fett gefütterten Tiere mit der Diät kein exogenes Citrat aufnehmen. Warum aber Isocitrat bei den Hungertieren unverändert blieb, ist schwer ver-

ständig, doch könnte 24stündiger Nahrungsentzug noch nicht ausreichend sein, um Citrat und Isocitrat zu reduzieren.

In diesem Zusammenhang erscheinen die Untersuchungen von P. Felts (36a) bemerkenswert, der vor kurzem ein ähnliches Verhalten von Citrat in der Rattenleber unter den verschiedenen Ketoseverhältnissen fand. Bei Hungertieren fand er allerdings ein Absinken des Citrats; hier betrug die Hungerdauer jedoch mehr als 48 Stunden.

Das Problem des Gehaltes von Citrat und Isocitrat der Leber hat noch einen weiteren Aspekt. Seit den Untersuchungen von Boxer und Stetten (15), Drury (31) und Langdon (78, 79) ist bekannt, daß die Fettsäuresynthese in der Leber hungernder und diabetischer Tiere gehemmt ist. Als Ansatzpunkt dieser Hemmung wurde von Numa, Lynen und Mitarb. (106) bei hungernden und von O. Wieland und Mitarb. (153) bei diabetischen Ratten die Malonyl-CoA Synthese aus Acetyl-CoA gefunden. Diese Carboxylierungsreaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese (106, 153, 46). Die Acetyl-CoA Carboxylase wird durch Citrat oder Isocitrat in ihrer Aktivität erheblich gesteigert (106, 78, 17, 29), und ohne diese Säuren ist die Malonyl-CoA Synthese stark gehemmt. Es schien daher möglich, daß als Ursache der Synthesehemmung der Fettsäuren ein Absinken von Citrat und Isocitrat verantwortlich sein könnte, wie dies im Falle von Hungerratten von Regen (92) gefunden wurde.

Nachdem Untersuchungen über dieses Problem eine Hemmung der Acetyl-CoA Carboxylase durch aktivierte Fettsäuren (13, 14) ergaben, rückt die Bedeutung des Citrat- und Isocitrateffektes auf das Enzym in diesem Zusammenhang mehr in den Hintergrund (151). Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß nach Numa (106a) Citrat kompetitiv zu Acyl-CoA auf das genannte Enzym wirkt und die Hemmung aufheben kann.

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuchstiere und Ketoseerzeugung

Für alle Versuche wurden männliche Albinoratten (Sprague-Dawley Stamm)⁺ verwandt. Die Tiere erhielten eine Standarddiät⁺⁺ und Wasser ad libitum. Der Diabetes wurde durch einmalige i.v. Injektion von umkristallisiertem Alloxan (40 mg/kg Körpergewicht, 4 % in physiol. Kochsalzlösung) oder durch subcutane Applikation (160 mg/kg Körpergewicht) erzeugt. Von 10 Ratten zeigten im Durchschnitt 4 am 2.Tag nach der Alloxangabe Hyperglykämie und Glucosurie (67). Der Rest der Tiere war gegenüber Alloxan unempfindlich oder starb an den toxischen Wirkungen.

Die Diabetestiere bekamen pro die ca. 3 IE Depotinsulin (Fa. Hoechst) bei freier Futterwahl. Zur Erzeugung eines chronischen Diabetes wurde die Insulinmenge allmählich während einiger Tage zunehmend verringert und schließlich abgesetzt. Die Tiere kamen einige Wochen nach Absetzen des Insulins zum Versuch. Sie zeigten zu diesem Zeitpunkt ausgeprägte Hyperglykämie und Glucosurie, jedoch nur noch geringe Ketosen und waren stark abgemagert (Blutzucker nach 12 Stunden Fasten 418 mg%, Harn-

⁺ Versuchstieranstalt W.Gassner, München-Ottobrunn.

⁺⁺ Firma Laatz, Euskirchen/Rhld., oder Altromin-R der Firma Altrogge Laage/Lippe.

zuckerausscheidung in 24 Stunden 3,9g, Blutacetacetat unter 1 mg%).

Der akute Diabetes wurde erzeugt, indem die Insulinbehandlung plötzlich abgebrochen wurde. Zusätzlich erhielten die Ratten einige Stunden vor Tötung Dexamethason oder (und) Scherisolon subcutan injiziert.

Die Tiere kamen 1 bis 3 Tage nach Absetzen des Insulins zum Versuch und zeigten zu diesem Zeitpunkt Ketoacidosen mit einem mittleren Blutacetacetatspiegel = 16,8 mg% ($n = 8$).

Die alimentären Ketosen wurden durch ausschließliche Verfütterung von geräuchertem Schweinespek an normale Ratten hervorgerufen (Blutacetacetat 10,5 mg%, $n = 12$). Hungerten die Tiere zunächst 48 Stunden, und bekamen sie dann für 72 Stunden Speck zu fressen, so ließ sich der Ketosegrad verdoppeln (Blutacetacetat 20,3 mg%, $n = 10$).

Die Blutzuckerbestimmungen erfolgten colorimetrisch (42), der Harnzucker wurde enzymatisch (65) und Acetacetat im Blut nach Walker (134) bestimmt.

Organentnahme und Extrakterstellung

Zur Organentnahme wurde den Tieren in Äthernarkose in einem Medianschnitt bis zum Rippenbogen das Abdomen eröffnet und ein Leberlappen vorsichtig mit zwei Pinzetten angehoben. Der Leberlappen wurde mit einer in flüssiger Luft vorgekühlten Spezialzange (58, 154) mit einem

Schlag erfaßt und mit einem Skalpell vom übrigen Organ abgetrennt. Die Zange mit der entnommenen Leber kam sofort in flüssige Luft. Über die Backen der Zange hervorstehende Gewebeteile wurden verworfen, so daß nur von der Zange fest umschlossene Leberanteile für die Substratbestimmungen zum Einsatz kamen (58).

Bei den Versuchen mit Teilhepatektomie und späterer zweiter Leberentnahme wurde vor dem Frierstopp eine lockere Ligatur um den zentralen Anteil des betreffenden Leberlappens gelegt und diese nach Gefrieren des Lappens angezogen und sicher abgebunden. Die Bauchdecken wurden nach Jodierung schichtweise vernäht. Bei der 2. Leberentnahme wurde ein vom zuerst entnommenen Leberlappen entfernterer und von Narbengewebe verschonter, normal durchbluteter Leberanteil im Frierstopp entnommen.

Im Kühlraum wurde die Leber in einem Porzellanmörser, der etwas flüssige Luft enthielt, mit einem Pistill in kleinere Stücke zerteilt. Diese wurden auf einer Torsionswaage angewogen und anschließend sofort im 4fachen Volumen eisgekühlter 6 % Perchlorsäure im Potter-Elvehjem Homogenisator (114) aufgeschlossen. (Für die Citratbestimmungen wurde 7 % Trichloressigsäure verwandt und die sauren Extrakte in den Test eingesetzt.) Die Pulverisierung der Leber unter Kühlung mit flüssiger Luft nach Bücher (58) brachte keine Unterschiede zur geschilderten Methodik in bezug auf den Isocitratgehalt. Das Homogenisat wurde 20 min. bei 10000 x g abzentrifugiert. Für die Iso-

citratbestimmungen wurden die Extrakte mit 3 n K_2CO_3 im Eisbad unter Rühren neutralisiert. Das pH wurde dabei durch Tüpfeln mit einem feinen Glasstab (Indikatorpapier, Fa. Merck) kontrolliert. Pro Testansatz wurden Extraktmengen eingesetzt, die 40 bis 80 mg Frischleber entsprachen.

Bestimmung der Citronensäure

Citrat wurde nach Natelson (98, 103) bestimmt. Der Methode liegt die Oxydation der Citronensäure zu Pentabromaceton und Umwandlung des letzteren in einen stabilen Farbkomplex zugrunde. Die Farbtintensität ist dem vorhandenen Citrat proportional. Sie wird in einem Spektralphotometer bei 430 mμ Wellenlänge bestimmt.

Reagentien: Citronensäure p.A. (Fa. Merck, Darmstadt).

Stammlösung: 50 mg Citronensäure werden ad 50 ml in 1n H_2SO_4 gelöst.

18 n H_2SO_4 , 1 M KBr, 5 % $KMnO_4$, 6 % H_2O_2 , Heptan (Sdp. 97°-99°C).

Thioharnstofflösung: 2 Gramm Borax werden in 100 ml 4 % Thioharnstofflösung gelöst.

Das pH soll 9,2 betragen.

Durchführung der Citronensäurebestimmung

Entfernung störender Substanzen: Vom Extraktüberstand pipettiert man einen Teil (mindestens 10 μg Citrat ent-

haltend) in ein 15 ml-Glas (Jenaer Glas, Glasschliffstopfen, 1 ml-Marken). Anschließend wird mit dest. Wasser und 0,1 ml 18n H_2SO_4 bis zum Endvolumen 3 ml aufgefüllt. Die Probe kommt in ein Ölbad von $120^\circ - 140^\circ\text{C}$ und wird bis auf 1 ml eingedampft. In das Glas gibt man kleine Glassplitter oder man stellt dünne Glasstäbe hinein, um dem Siedeverzug vorzubeugen. Dieser Hitzeschritt entfernt störende Substanzen wie β -Ketosäuren, Acetaldehyd und Aceton.

Umwandlung zu Pentabromaceton: Zu der abgekühlten Lösung werden 5 Tropfen einer 1 M KBr-Lösung und anschließend 10 Tropfen einer 5 % KMnO_4 -Lösung unter Schütteln zugegeben. Die Lösung bleibt 10 min. stehen und während dieser Zeit wird der KMnO_4 -Überschuß, angezeigt durch die purpurne Farbe, aufrechterhalten. Die Probe kommt dann in ein Eisbad, und der Permanganatüberschuß wird unter Schütteln des Glases durch tropfenweise Zugabe einer 6 % H_2O_2 -Lösung beseitigt. Besonders zu beachten ist, daß kein Peroxydüberschuß entsteht.

Extraktion des Pentabromacetons: Zu der Probe pipettiert man 2,5 ml Heptan. Das Glas wird mit einem gut passenden Schliffstopfen und etwas Siliconfett sicher verschlossen und anschließend 10 min. mechanisch geschüttelt. Das Pentabromaceton geht hierbei in die Heptanphase über. Nach dem Schütteln trennen sich die beiden Phasen meist von allein, andernfalls kann kurz abzentrifugiert werden.

Bildung des Farbkomplexes: 2 ml der Heptanphase werden in ein kleines Glas (z.B. Antibiotikagefäße der Industrie) überpipettiert und 4 ml Thioharnstofflösung dazugegeben. Das Glas wird mit einem Kunststoffdeckel verschlossen (Gummi reagiert mit Thioharnstoff) und 10 min. mechanisch geschüttelt. Es bildet sich nun je nach Citratgehalt ein mehr oder weniger stark gefärbter gelber Farbstoff.

Photometrische Messung:

Gerät: Zeiss-Spektralphotometer, $d = 2 \text{ cm}$, $\lambda = 430$ und $650 \text{ m}\mu$.

In eine Küvette pipettiert man genügend von der wässrigen Phase. Dabei ist zu beachten, daß keine feinen Heptanperlen mit in die Küvette gelangen, die die Messung stören. Von jeder Probe wird eine Messung bei 430 (Absorptionsmaximum des Farbkomplexes) und eine zweite Messung bei $650 \text{ m}\mu$ gegen Luft durchgeführt. Aus der Differenz der beiden Extinktionswerte erhält man einen Wert, der mögliche Trübungen ausschließt. Bei jeder Bestimmung läuft ein Leerwert, der statt Extrakt dest. Wasser enthält, durch sämtliche Versuchsschritte mit. Die Extinktion des letzteren liegt bei 0 bis 0,01 und wird vom Hauptwert abgezogen.

Zeigen sich bei der photometrischen Messung einer Probe Extinktionsänderungen, so sind diese durch feinste Gasbläschen bedingt, die bei der letzten Schüttelung entstehen. In einem solchen Fall läßt man die Probe einige

Zeit offen stehen, bevor die Extinktion abgelesen wird. Der Farbstoffkomplex erwies sich bei Extinktionskontrollen innerhalb 24 Stunden (aufbewahrt bei $+4^{\circ}\text{C}$) als völlig stabil. Da das pH der Thioharnstoff-Borax-Lösung die Farbstoffbildung stark beeinflusst, ist für jeden Versuch eine Überprüfung des pH der Lösung am pH-Meter erforderlich. Die Farbstoffintensität war in diesen Versuchen wesentlich stärker, als nach den Literaturangaben erwartet wurde. Für 63 nM Citrat im Ansatz fand sich eine Extinktion von 0,1.

Die Eichkurve für die Methode ist in Abb.4 wiedergegeben. Bei drei Wiederfindversuchen, in denen Citrat vor dem Homogenisieren zugesetzt wurde, fanden sich 97, 97,3 und 100,8 % wieder.

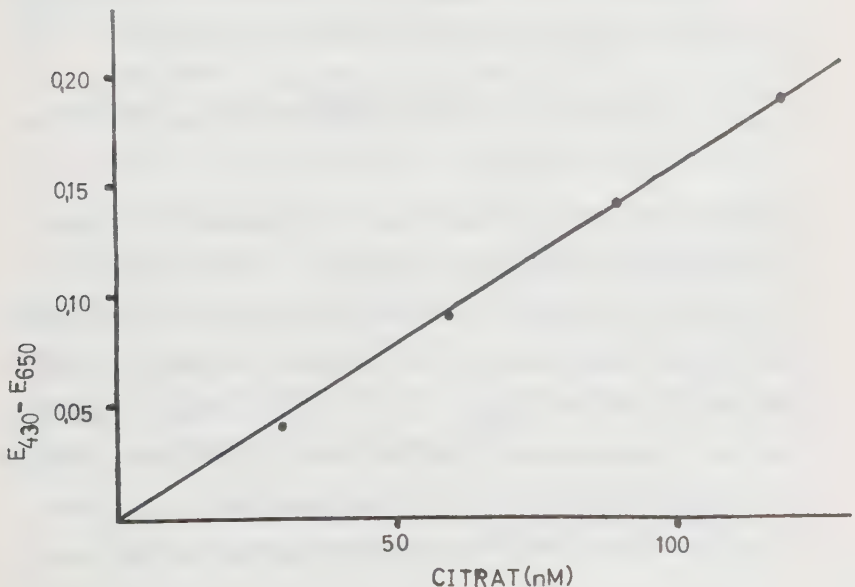


Abb.4: Eichkurve für die Citratbestimmung nach Natelson

Bei Prüfung der Methode auf ihre Spezifität fand sich bei Zusatz von β -Oxybuttersäure, Acetacetat und Malat in einem Gemeinschaftsansatz mit Leberextrakt ein um 35 % erhöhter Citratwert im Vergleich zum Wert vom gleichen Extrakt ohne Zusatz. Obwohl Aceton und AcAc bei der Vorbereitung zerstört werden, verbleiben offenbar ausreichende Mengen an β -Oxybuttersäure und Malat, um die Citrat-Bestimmung zu verfälschen. Die Methode wurde daher für Bestimmungen bei Ketosetieren nicht benutzt.

Bestimmung der Isocitronensäure

a.) Stöchiometrischer Umsatz

Die enzymatische Bestimmung von Isocitrat erfolgt im direkten optischen Test nach folgender Gleichung:

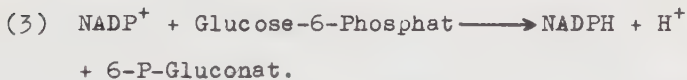


Dabei wird am Enzym Isocitratdehydrogenase Isocitrat durch NADP stöchiometrisch oxydiert, und das entstehende NADPH im Photometer bei der Wellenlänge 366 m μ gemessen. Unter Zugrundelegung des molaren Extinktionskoeffizienten für NADPH ($\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6$ [cm²/Mol]) liegt die Empfindlichkeitsgrenze der photometrischen NADPH Messung bei etwa 10⁻⁵ Mol/Liter. Bei mehreren Versuchen, Isocitrat auf diese Weise in der Rattenleber zu bestimmen,

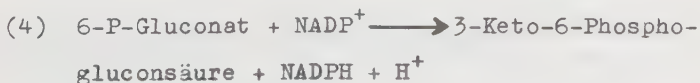
zeigte sich, daß der Isocitratgehalt die unterste Empfindlichkeitsgrenze nicht erreicht. Für die Bestimmung von Isocitrat in Rattenleber mußte daher eine empfindlichere Methode ausgearbeitet werden.

b.) Katalytischer Umsatz

Das Prinzip der katalytischen Methode liegt darin, daß die oben beschriebene Reaktion (Gl.1) mit einer hochempfindlichen NADPH Bestimmung (84a) gekoppelt wird.



In diesem katalytischen Test (2 und 3) durchläuft NADPH bzw. NADP beide Reaktionen immer wieder zyklisch. Bei einem Überschuß (ca. 0,025 bzw. 0,005 M) an α KGS und G-6-P und bei genügend hohen Konzentrationen von GLDH, Zwischenferment und NH_4^+ wirkt NADPH allein geschwindigkeitsbestimmend. Unter den unten beschriebenen Bedingungen werden pro 1 Mol eingesetztem NADPH in 30 Minuten 5000 bis 10000 Mole 6-P-Gluconat gebildet. Nach Ablauf der Reaktion wird der Ansatz durch Erhitzen gestoppt und das gebildete 6-P-Gluconat mit seiner Dehydrogenase photometrisch bestimmt (60).



Für jede Versuchsreihe muß in den katalytischen NADPH Test eine Bezugsprobe mit einer bekannten NADPH Menge eingesetzt werden. Sie dient zusammen mit den 6-P-Gluconatwerten der Hauptproben als Berechnungsgrundlage für das NADPH der Hauptproben. Die NADPH Lösung für die Bezugsprobe wird durch Verdünnung aus einer konzentrierteren Lösung hergestellt (ca. 10^3 fach). In der letzteren kann NADPH mit Glutathion-Reduktase optisch bestimmt werden.



Während sich mit der direkten enzymatischen Isocitratbestimmung in einem der üblichen Photometer (z.B. Photometer Eppendorf) Konzentrationen bis 10^{-5} molar testen lassen, wird im angegebenen indirekten Isocitrat-Test die Empfindlichkeit um das 100fache gesteigert und Konzentrationen bis 10^{-7} molar ($100 \text{ pM}^+/\text{ml}$) lassen sich noch exakt erfassen. Das Prinzip des katalytischen NADPH-Testes ist in Abb. 5 schematisch wiedergegeben.

Notwendige Reagentien

- I. MnSO_4 0,02 M: 67,6 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ mit bidest. Wasser ad 20 ml lösen.
- II. TRIS-HCL-Puffer 0,1 M, pH 7,4: 6,043 g Tris-hydroxymethylaminomethan in 100 ml bid. Wasser lösen, mit

⁺) 1 piko Mol = 10^{-12} Mol.

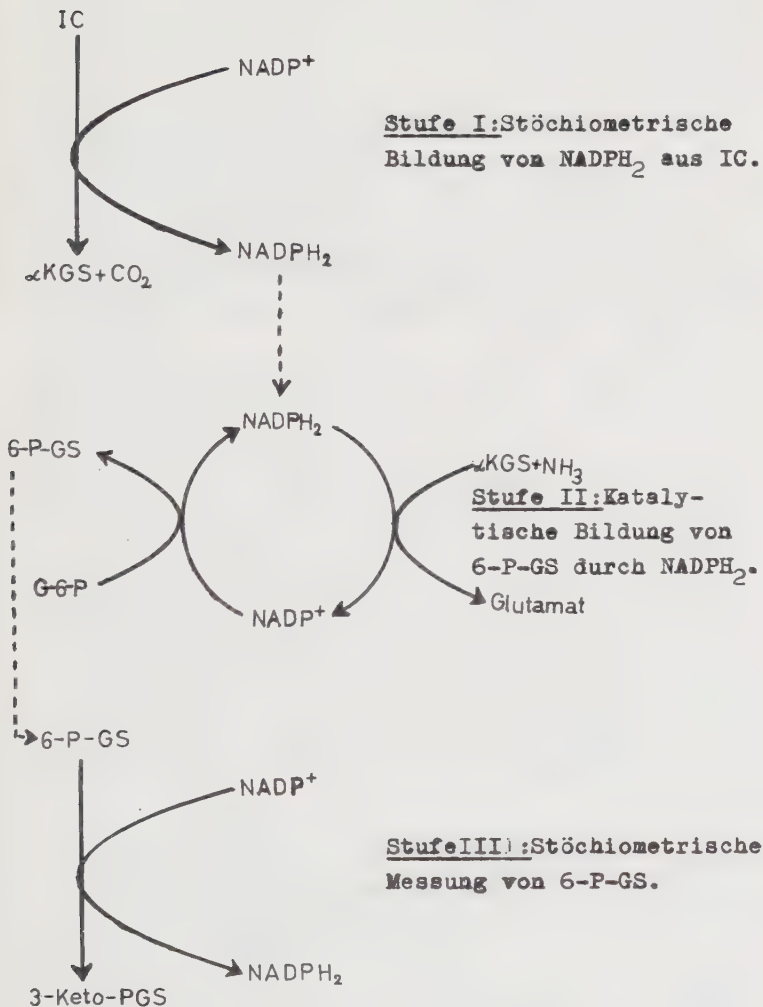


Abb. 5: Reaktionsfolge bei der indirekten Isocitratbestimmung.

2n HCL auf pH 7,4 einstellen und mit bid. Wasser
ad 500 ml auffüllen.

III. ADTA 0,1 M.

IV. NaOH, 2n.

V. Stammlösg. für den NADPH Test: 1) Tris-HCL Puffer
0,5 M, pH 7,85. 2) α -KGS 0,025 M (36,6 mg ad 10ml).
3) G-6-P 0,005 M (15,21 mg ad 10 ml). 4) NH_4 -
Acetat 0,25 M. 5) Rinderalbumin (Behring Werke,
Marburg), 10 mg mit bid.Wasser ad 1 ml lösen.

Die Stammlösg. wird durch folgende Mischung erhalten:
7 ml der Lösg.1), je 5 ml der Lösg.2) und 3),
2,5 ml der Lösg.4) und 0,5 ml der Lösg.5) mit bid.
Wasser ad 25 ml auffüllen. Die Stammlösung ist bei
-20°C 2 Wochen haltbar.

VI. NADP*: Lösung a) ca. 5×10^{-2} M: 12 mg NADP- NaH_2
in 0,3 ml Lösg.II lösen. Lösg.b) ca. 5×10^{-3} M.

VII. NADPH*: Lösg.a) ca. 5×10^{-4} M: 2,5 mg NADPH- Na_4
mit 1 % NaHCO_3 pH 9 ad 6 ml lösen. Lsg.b) $5 \times$
 10^{-7} M.

VIII.IDH*, in Pulverform oder als salzfreie Lösung in
50 % Glycerin mit 10 mg Enzymprotein in 1 ml.
Die Gebrauchslösg. wird 1:1 mit bidest.Wasser ver-
dünnt.

IX. GLDH*: 20 mg Protein in 1 ml 50 % Glycerin.

*) = Präp.der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim

- X. G-6-PDH*: 5 mg Protein in 1 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung.
Das störende Sulfat wird jeweils vor Gebrauch entfernt: Zentrifugieren der Kristallsuspension, Verwerfen des Überstandes und Aufnahme des Rückstandes in gleiches Volumen 2M NH_4 -Acetat.
- XI. Glutathion, oxydiert: 30,5 mg GSSG in 1 ml bidest. Wasser (pH 6) lösen, ca. 5×10^{-2} M.
- XII. Glutathion-Reduktase*. Die Gebrauchslösung wird durch Verdünnen 1:10 aus dem Handelspräparat hergestellt.
- XIII! 6-P-GDH, Darstellung s.S.57
- XIV. Isocitratlösung (8).
Stammlösg. (0,05 M D-Isocitrat, pH 7,4): 435 mg DL-Isocitronensäurelacton (Fa.Schuchardt, München) in 10 ml bidest.Wasser, pH mit 1 n KOH auf 9 bringen (Indikatorpapier), Lösg. 10 min. im kochenden Wasserbad halten und dabei pH mit 1 n KOH bei 9 halten. Anschließend abkühlen lassen, pH mit 2 n HCL auf 7,4 bringen und mit bidest.Wasser ad 25 ml auffüllen.
Gebrauchslösg. (5×10^{-5} M D-Isocitrat): 0,1 ml der Stammlösg. vor Gebrauch mit bidest.Wasser ad 100 ml auffüllen.
Die enzymatische Isocitratbestimmung in der Gebrauchslösung ergab einen Wert von 100,4 %.

*) = Präp. der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim

Durchführung der Isocitratbestimmung im Leberextrakt

Bereits bei der Extraktgewinnung wird durch Ansäuern das störende endogene NADPH vernichtet. Der Extrakt wird im Eisbad mit 3n K_2CO_3 unter Rühren auf pH 7,5 eingestellt. Vor stärkerer alkalischer Reaktion ist der Extrakt zu bewahren, da das endogene NADP für den ersten Versuchabschnitt erhalten bleiben soll. Leichte NADP Verluste spielen keine Rolle, weil Rattenleber den 10- bis 20fachen Gehalt an NADP gegenüber Isocitrat bei der beschriebenen Extraktgewinnung aufweist. Wird ein IDH Präparat benutzt, das noch Glutathion-Reduktase enthält, so müssen die Extrakte mit einem Kationenaustauscher (Dowex 50 Na-Form oder Amberlite IR-120) behandelt werden, um Glutathion zu entfernen. Vorgehen: Der neutralisierte Extrakt wird 5 min. mit dem Kationenaustauscher verrührt (auf 1 ml Extrakt ca. 0,5 g Dowex 50 Na-Form), vom Überstand abpipettiert und das pH mit 3 % PCS auf 7,5 eingestellt.

In drei 10ml-Zentrifugengläser pipettiert man

	Glas A	Glas B	Glas C
Extrakt	0,30 ml	0,30 ml	0,30 ml
$MnSO_4$ (Lösg.I)	0,03 "	0,03 "	0,03 "
TRIS (Lösg.II)	0,20 "	0,20 "	0,20 "
Dest. Wasser	0,50 "	0,51 "	0,01 "
IDH	0,01 "	-	-
NADPH (Lösg.VII b)	-	-	0,50 "
	1,04 ml	1,04 ml	1,04 ml

Glas A enthält den Messansatz, Glas C einen Kontrollwert, der nicht unbedingt nötig, aber zur Sicherheit zu empfehlen ist. Glas B enthält den Nullwert.

Alle drei Proben bleiben 5 min. bei Zimmertemperatur stehen. Dann werden sie in ein Eisbad gestellt, und man gibt zu jedem Glas 0,03 ml 0,1 M ADTA (pH 9). Anschließend Zugabe von 0,04 ml 2n NaOH. Am pH-Meter wird das pH überprüft. Es soll in allen Gläsern gleich sein und zwischen 12 und 12,5 liegen.

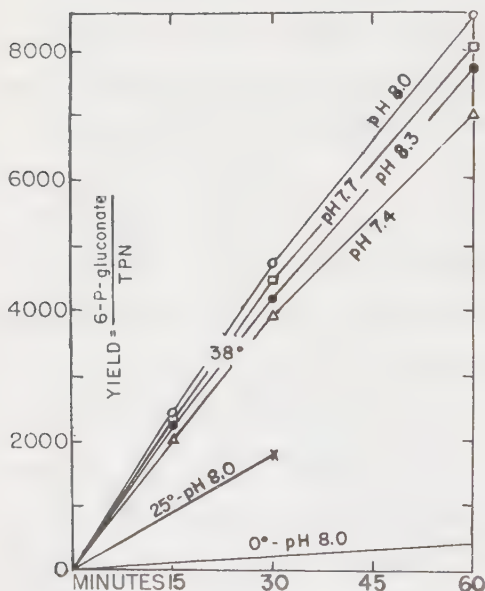
Die Gläser kommen nun für 12 min. in ein Wasserbad von 60°C. Bei diesem Schritt wird das NADP völlig zerstört, während NADPH nicht angegriffen wird. Anschließend kommen alle Gläser in ein Eisbad.

Für den nun folgenden katalytischen NADPH Test nimmt man 4 neue Zentrifugengläser und pipettiert hinein:

	Glas A'	Glas B'	Glas C'	Glas D'
Stammlösung	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
GLDH	0,02 "	0,02 "	0,02 "	0,02 "
G-6-PDH	0,01"	0,01 "	0,01 "	0,01 "
Probe	0,03 " (Gl.A	0,03 " Gl.B	0,03 " Gl.C	0,03 " Gl.B
NADPH $5 \times 10^{-7} M$	-	-	-	0,02 ml
Na ₂ HCO ₃ , 1% (NADPH Lösg. mittel)	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	-
	1,08 ml	1,08 ml	1,08 ml	1,08 ml

Gestartet wird bei Glas A' bis C' durch Zugabe der entsprechenden Proben, in Glas D' (Bezugsprobe) mit NADPH

und gleichzeitiges Einbringen der Gläser in ein Wasserbad von 38°C für 30' min. Durch Zugabe der stark alkalischen Proben zu den Ansätzen nähert sich das pH von 7,85 dem optimalen Wert von pH 8 (s. Abb. 6). Die NADPH



Konzentration soll in jeder Probe zwischen 3×10^{-9} und 10^{-8} M liegen.

Abb. 6:
Der Einfluß des pH Wertes, der Temperatur und der Zeit auf den NADPH Zyklus (aus Lowry et al., 84a)

Nachdem jedes Glas nach der Stoppuhr 30 min. im Wasserbad gestanden hat, wird durch Einbringen der Ansätze in ein kochendes Wasserbad für 2 min. die Reaktion jeweils abgestoppt. Dabei entsteht ein Niederschlag der Proteine, der die spätere photometrische Messung stört. Er wird entfernt, indem jedes Glas in kaltem Wasser abgekühlt und leicht geschwenkt wird. Das dabei entstehende fädige Gebilde kann leicht mit einem Glasstab herausgeholt werden,

evtl. abzentrifugieren.

Die Proben werden nun auf ihren Gehalt an 6-P-Gluconat in der genannten NADP abhängigen Reaktion mit 6-P-GDH getestet.

Testansatz:

Schmalküvette, d = 2 cm. Wellenlänge λ = 366 mμ.

Gerät: Photometer Eppendorf mit automatischer Extinktionsschreibung (Kompensograph).

In die Küvette wird pipettiert

1,3	ml	TRIS-Puffer	0,05 M, pH 8
0,5	"	Probe	
0,02	"	ADPA	0,1 M
0,02	"	6-P-GDH	
0,01	"	NADP	5×10^{-2} M
1,85	ml	Testvolumen	

Gestartet wird die Reaktion nach vorherigem gutem Durchmischen und gleichbleibendem Vorlauf durch Zugabe von NADP. Gemessen wird die Extinktionszunahme $E_2 - E_1 = \Delta E$. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ (8). Für den 6-P-G Wert in nM im katalytischen NADPH Test ergibt sich bei den genannten Verdünnungsverhältnissen folgende Berechnungsformel:

$$6\text{-P-G} = \frac{\Delta E \times 1,85 \times 10^3}{2 \times 3,3} \times \frac{1,08}{0,5}$$

Die Bestimmung des NADPH der Bezugsprobe erfolgt eben-

falls im optischen Test mit oxydiertem Glutathion und Glutathion-Reduktase (25). Gemessen wird die Extinktionsabnahme bis zum Endwert.

Testansatz: 1,60 ml TRIS Puffer 0,1 M, pH 7,4
 0,02 " GS3G 5×10^{-2} M
 0,10 " NADPH 5×10^{-4} M
 0,01 " GR

 1,73 ml Testvolumen.

Die Bedingungen des Testes und die Berechnung sind ähnlich wie bei der 6-P-G Bestimmung. Unter Berücksichtigung des 10^3 fachen Konzentrationsunterschiedes zwischen getesteter und eingesetzter Lösung erhält man den NADPH Wert der Bezugsprobe.

Der Isocitratgehalt im eingesetzten Extrakt beträgt

$$\text{Isocitrat (in } \mu\text{M)} = \frac{G_h \times N}{G_b} \times \frac{111}{3}$$

dabei bedeutet G_h = 6-P-G Wert der Hauptprobe des katalytischen Tests in nM.

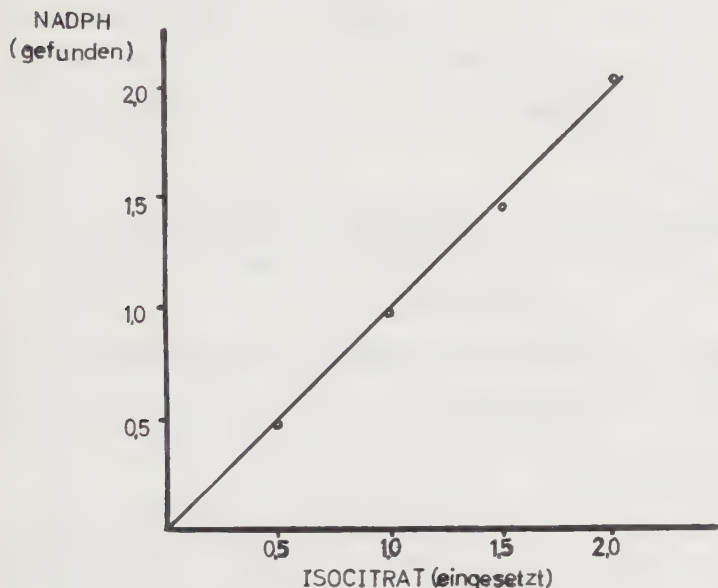
G_b = 6-P-G Wert der Bezugsprobe des katalytischen Test in nM.

N = NADPH Wert der Bezugsprobe in μM .

Eichkurve

Bei der Aufstellung einer Eichkurve wurde eine Isocitratlösung, die vorher direkt enzymatisch getestet worden war, an Stelle des Extraktes und unter Zugabe von

NADP in den beschriebenen Isocitrat-Test eingesetzt. Dabei fanden sich prozentual zu den direkt enzymatisch getesteten Isocitratausgangswerten 96 %, 99 %, 97 % und 101 % wieder.



**Abb. 7 :Eichkurve für die Isocitratbestimmung.
Alle Werte in nM.**

Extraktabhängigkeit

Werden verschiedene Mengen Leberextrakt in den Isocitrat-Test eingesetzt, so ergibt sich die in Abb. 8 dargestellte Abhängigkeit.

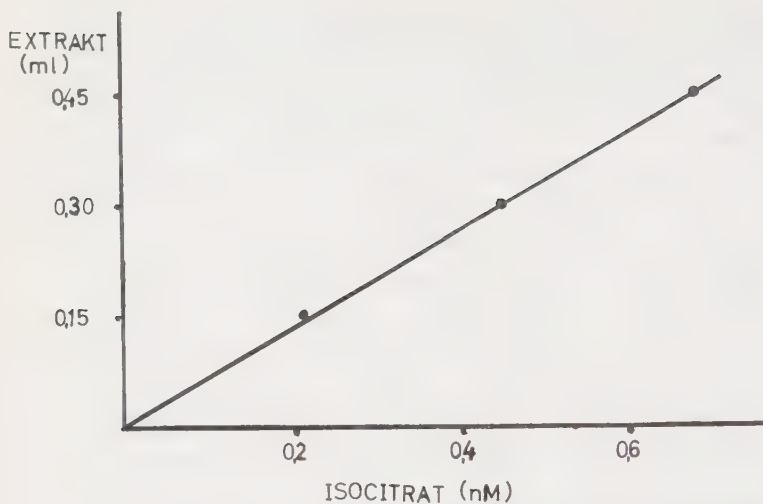


Abb. 8 : Isocitratabhängigkeit vom eingesetztem Leberextrakt.

Wiederfindversuche

Hierbei wurde eine Versuchsreihe aufgestellt, in der Rattenleberextrakte einmal ohne und das andere Mal mit Isocitratzusatz getestet wurden. Isocitrat wurde jeweils vor dem Homogenisieren zugegeben. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Leberisocitrat	zugesetzt	berechnet	gefunden	%
3,63	5	8,63	8,60	99,5
3,57	10	13,57	12,80	94,5
2,86	5	7,86	7,23	92,0
2,86	10	12,86	12,45	97,0

Tabelle 9: Ergebnisse der Wiederfindversuche.
Alle Isocitratwerte sind in nM angegeben.

Störmöglichkeiten der Isocitrat-Bestimmung

- 1) Da der katalytische Test noch bis unter 3 pM NADP bzw. NADPH (ca. $2,4 \times 10^{-6}$ µg) anzeigt, ist auf peinlichste Reinhaltung der Hände, Pipetten und Lösungen zu achten. Verunreinigungen mit dem Coenzym zeigt ein erhöhter Nullwert an. Ein erhöhter Nullwert ist auch durch mangelhafte NADP Zerstörung während des Hitzeschrittes möglich.
- 2) Bei Ausfall eines braunen Niederschlages nach Alkalisieren der Proben handelt es sich um Braunstein. Ursache ist eine zu geringe ÄDTA Konzentration.
- 3) Zu niedrige Isocitratwerte finden sich, wenn entweder NADPH des ersten Versuchsabschnittes zerstört wird (durch Säuerung, zu langes/oder zu starkes Erhitzen der Ansätze), oder wenn die NADPH-Lösung für die Bezugsprobe mit NADP verunreinigt ist. Letzteres kann durch 10 min. Erhitzen bei 60°C und pH 12,5 behoben werden.

Spezifität der verwendeten Enzympräparate

Die verwendete IDH wurde mit entsprechenden Substraten und Coenzymen auf Fremdaktivitäten geprüft. Es konnte keine G-6-PDH, GLDH und 6-P-GDH nachgewiesen werden. In der anfangs verwendeten IDH in Pulverform konnte keine GR nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich in einem später benutzten IDH Präparat in 50 % Glycerin eine deutliche GR Aktivität. Dieser störende Faktor läßt sich durch

GSSG Entfernung mit einem Kationenaustauscher aus den Extrakten beheben (vgl. S.48). Da der katalytische Test nur auf NADP bzw. NADPH anspricht, können NAD abhängige Fremdaktivitäten des IDH Präparates (im Gegensatz zum direkten Isocitrat-Test!) keine Störungen hervorrufen.

Für die Reinheit der verwendeten IDH in bezug auf NADP abhängige Fremdaktivität sprechen folgende Versuche:

In einer Küvette mit Tris-Pufferlösung, Isocitrat und NADP Überschuß, MnSO_4 (ca. 10^{-3} M) und ADTA (ca. 5×10^{-3} M) nimmt die Extinktion nach Zugabe von IDH stark zu. Erhöht man jetzt die ADTA Konzentration (ca. 10^{-2} M), so hört die Extinktionszunahme auf. Durch Zugabe von Mn^{++} im Überschuß läuft der Test wieder. Bei Vorhandensein von IDH und aller anderen Reaktionspartner kann also der Reaktionsablauf durch ADTA unterbunden werden (s. Abb.9). Setzt man nun bei einer Extrakttestung auf Isocitrat einen Ansatz ein, der ADTA im Überschuß und IDH enthält, so ergibt sich wie beim Nullwertansatz (der keine IDH enthält) keine Extinktionsänderung und damit keine NADPH Bildung.

NADPH verbrauchende Fremdaktivitäten lassen sich weitgehend folgendermaßen ausschließen (bei GR Nachweis entsprechende Extraktbehandlung vorausgesetzt). In 2 Testansätzen bestimmt man einmal Isocitrat allein (Extrakt, Tris-Pufferlösung, MnSO_4 und IDH), das andere Mal Isocitrat und eine zugesetzte definierte NADPH Menge. Das vollständige Wiederfinden der eingesetzten NADPH Menge,

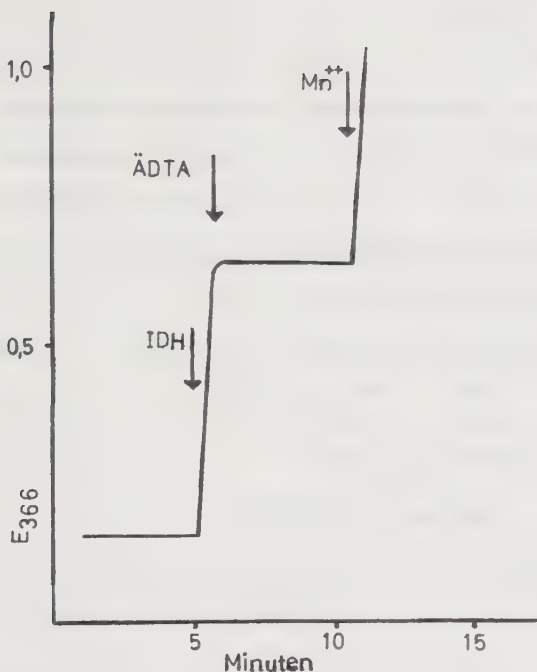


Abb.9: Die Hemmung der Isocitratoxydation durch ÄDTA im optischen Test

sich errechnend aus der Differenz der beiden Versuchsergebnisse, beweist das Fehlen NADPH oxydierender Reaktionen.

Die im Handel befindlichen Enzyme GLDH und G-6-PDH enthalten keine den katalytischen Test störenden Fremdaktivitäten (84a, 8).

Anreicherung der 6-P-Gluconatdehydrogenase ⁺

Es wurde nach einem abgeänderten Verfahren von Lowry

⁺) Für die guten Ratschläge danke ich herzlich Frau Ingrid Eger-Neufeldt, München, und Herrn Dr.G.Löffler, Homburg/Saar.

(84a) vorgegangen.

Vorbemerkung: Alle Arbeiten finden im Kühlraum bei $0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$ statt. Die Niederschläge werden durch Abzentrifugieren bei $8000 \times g$ für 25 min. gewonnen. Der verwendete Phosphatpuffer ist 0,025 M. In allen anfallenden Fraktionen werden Aktivitätsbestimmungen auf 6-P-GDH durchgeführt. Der Testansatz enthält

Tris-Puffer 0,05 M, pH 8

ADTA 1 mM

NADP 0,5 mM

6-P-G 0,5 mM

$d = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 366 \text{ m}\mu$, $t = 20^{\circ}\text{C}$.

1 EE ist definiert als die Enzymmenge, die unter Testbedingungen in einer Minute 1nM NADP reduziert. Der Proteingehalt der Enzymlösungen wurde mit der Biuretmethode bestimmt (7). Spez.Aktivität = EE/mg Protein.

Vorgehen

100 Gramm Rattenleber werden im 9fachen Volumen Phosphatpuffer pH 7,5 im Starmix homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren wird im Überstand die 6-P-GDH Aktivität bestimmt. EE = 204 000.

1. Fällungsserie mit Ammonsulfat: Dem Überstand wird unter mechanischem Rühren fein gemahlenes, trockenes Ammonsulfat bis zur Konzentration 1 M zugegeben (97). Der geringe Niederschlag wird verworfen. Dann wird dem Überstand weiter Ammonsulfat bis 2 M zugesetzt, der Niederschlag

verworfen und die Konzentration auf 3 M Ammonsulfat erhöht. Dieser Niederschlag enthält nur 13 % der Gesamtaktivität. Die Niederschläge zweier weiterer Fällungen bei 80 % und 87 % Ammonsulfatsättigung werden im 3fachen Volumen Phosphatpuffer aufgenommen. EE = 85 000.

Dialyse: Die klare rötliche Lösung wird für 12 Stunden gegen 3 Liter Phosphatpuffer mit 0,2 mM ÄDTA dialysiert. Das Dialysat wird durch Verdünnen mit Phosphatpuffer auf 1 % Proteinkonzentration gebracht.

Protaminsulfatbehandlung: Zur Entfernung der Nucleinsäuren werden langsam 0,04 des Volumens einer 1% Protaminsulfatlösung (Ampullen der Fa. La Roche) zugesetzt. Der gewonnene Niederschlag wird verworfen. EE = 76 000.

2. Fällungsserie mit Ammonsulfat: Dem Überstand wird bis 60 % Sättigung Ammonsulfat zugesetzt und mit 1n NH_4OH wird die Lösung auf pH 7 eingestellt. Der Niederschlag wird verworfen. Im Überstand wird die Ammonsulfatsättigung auf 73 % erhöht. Der Niederschlag wird bis 15 ml in Phosphatpuffer aufgenommen. Anschließend wird dialysiert, wie oben beschrieben. EE = 40 700.

Eine Behandlung mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Gel führte zu stärksten Aktivitätsverlusten und wurde daher nicht durchgeführt.

Das genannte Vorgehen bringt eine Aktivitätsausbeute von 20 % und eine ca. 16fache Reinigung des Enzyms. Die Enzymlösung zeigt keine Aktivität an G-6-PDH und GLDH. Das tiefgekühlte Enzym ist über Monate stabil.

Versuche der Diabetes-Erzeugung durch totale
Pankreatektomie an der Ratte

Die totale Herausnahme des Pankreas zur Erzeugung eines Diabetes mellitus erfordert bei der Ratte im Vergleich zu anderen Tieren (.z.B. Hund) ein recht kompliziertes Vorgehen, was sich aus der diffusen Ausdehnung des Organs ergibt. Folgen dieser ungewöhnlichen Lage für die Operationsdurchführung sind die Schaffung einer relativ großen Wundfläche im Bauchraum, eine hohe Verletzungsgefahr für die von Pankreasgewebe umgebenen Organe und eine ausgedehnte Operationsdauer.

Das Pankreas der Ratte läßt sich in drei Abschnitte unterteilen (124a). Der erste liegt am Milzhilus und den Milzgefäßen, im Ligamentum gastrolienale und an der großen Magenkurvatur bei den rechten gastrolienalen Gefäßen (Op.-komplikation: Milzvenenthrombose, Verletzung der Magen Gefäße). Der 2. Abschnitt liegt im Mesoduodenum hinter dem Gallengang und rechts von den unteren pankreaticoduodenalen Gefäßen (hämorrhagischer Darminfarkt, Ileus). Der letzte Abschnitt umfaßt kleinere Pankreasteile direkt am Gallengang (gallige Peritonitis, Verschlußikterus).

Die Operation wurde in abgeänderter Form nach der von R.O. Scow angegebenen Technik durchgeführt (124a). Die von Scow angegebene Entfernung der beiden ersten Abschnitte im ganzen an Hand ihres jeweiligen Pankreasganges ließ sich nicht durchführen, da die Gänge und besonders ihre

zarten Abzweigungen bei dem benutzten Rattenstamm nicht die Festigkeit besitzen, um als Leitgebilde für die Präparation zu dienen.

Es wurden männliche Albinoratten vom Sprague-Dawley Stamm mit 100-150 Gramm Gewicht für die Operation benutzt. Die Tiere waren 8-12 Stunden vor dem Eingriff nüchtern. Operiert wurde unter einer Zeiss-Prismenlupe mit 10facher Vergrößerung, was für die Unterscheidung von Fett- und Pankreasgewebe wie auch für die Gefäßpräparationen unentbehrlich war. Für die Herausnahme des Gewebes wurden feine anatomische Pinzetten und zur stumpfen Mobilisierung Zahnstocher, die an einem Ende mit Watte umwickelt waren, benutzt. Alle Operationsinstrumente wurden im Überdruck-Heißdampfverfahren sterilisiert. Die Hände wurden durch mehrmaliges Waschen in 70 % Äthylalkohol desinfiziert.

Den Ratten wird in Rückenlage unter Äthernarkose (Rasur der Bauchdecken, Ätherwaschung, Jodanstrich) das Abdomen mit einem Medianschnitt, der rechts neben dem Xiphoid beginnt, eröffnet. Mit angeklemmten Tupfern werden Magen und Milz aus dem Abdomen herausgeholt und auf den unteren Thorax gelegt. Das Mesocolon transversum wird anschließend stumpf vom darüber liegenden Pankreasgewebe abgetrennt bis die Pfortader und das in sie einmündende Magen-Milzgefäß sichtbar wird. Dieser Magen-Milzgefäßstamm wird peripher der 2 Gefäßabgänge für den Magen (vena gastrica sinistra und v. gastroepiploica sin.) mit einer

doppelten Ligatur unterbunden. Dabei wird auch die unmittelbar anliegende Milzarterie miterfaßt. Die Milz besitzt jetzt noch eine zusätzliche Gefäßversorgung von den linken gastroepiploischen Gefäßen, welche zum oberen Milzpol zieht und hier unterbunden wird. Die vom Milzhilus zur großen Magenkurvatur ziehenden Teile des Pankreas und Omentum magus werden durchtrennt. Nach Durchtrennung der unterbundenen Gefäße werden Milz und die großen Pankreasbezirke an ihren Gefäßstielen herausgenommen.

Mit diesem Vorgehen wird das komplizierte Präparieren des Milzgefäßes und seiner Verzweigungen am Hilus erspart. Von Vorteil ist die Zeitersparnis und die Prophylaxe der häufig auftretenden Milzvenenthrombose. Nachteilig ist die bei Ratten nach Milzexstirpation auftretende Anfälligkeit gegen Barthonellen (hämolytischer Ikterus) und notwendige Behandlung mit Antibiotika.

Als nächster Schritt wird das Pankreasgewebe entlang der großen Magenkurvatur zum Pylorus hin stumpf abpräpariert. Die hier verlaufenden Gefäße sind für die Blutversorgung des Magens unerläßlich und dürfen nicht beschädigt werden.

Die Ratte wird nun so gedreht, daß der Kopf etwa nach 2 Uhr zeigt. Das Duodenum wird mit dem linken Daumen und Zeigefinger zur rechten Seite des Tieres gezogen. Das Pankreasgewebe wird stumpf und mit Pinzette vom Duodenum beginnend entlang dem Gallengang bis zur Leber hin entfernt. Ferner wird restliches Gewebe vom Pylorus her entlang den gastroduodenalen Gefäßen abpräpariert. Das Tier

wird nun um 180° gedreht und das Duodenum zu seiner linken Seite gezogen. Es werden dann Pankreasreste entlang dem Gallengang entfernt.

Die Ratte kommt nun in eine Stellung, in der der Kopf nach 9 Uhr zeigt. Das Duodenum wird zur linken Tierseite gezogen. Aus der Tiefe des Abdomen präpariert man dann entlang den unteren pankreaticoduodenalen Gefäßen zum Duodenum hin das Pankreas ab. Am Darm angekommen muß restliches Gewebe an der caudalen Duodenalschleife entfernt werden. Zum Schluß werden alle präparierten Stellen nochmals durchgesehen. Dies ist besonders wichtig in der Tiefe des Abdomens, an der Pfortader und den Abzweigungen der Milz- und Duodenalgefäße. Zurückgebliebene Pankreasreste werden mit der Pinzette entfernt.

Die Operationsdauer betrug 2 Stunden. Alle Tiere entwickelten postoperativ einen Diabetes mit Hyperglykämie und Glucosurie. Der Blutzucker betrug nach 24-48 Stunden Fasten 290 bis 460 mg%. Trotz aufwendiger postoperativer Versorgung überlebten die Tiere den Eingriff nur um wenige Tage. Die längste Überlebensdauer betrug 8 Tage. Durch Veränderungen an der Operationsmethodik wie auch der postoperativen Versorgung ließ sich das Ergebnis (bei insgesamt 56 operierten Tieren) nicht verbessern. Bei weniger radikalem Vorgehen (z.B. Stehenlassen kleiner Pankreasteile am Gallengang und Duodenum, Op.Dauer ca 1 Stunde) entwickelten die Tiere keinen Diabetes oder zeigten nur leichte Hyperglykämie. Bei ihnen traten kei-

ne Komplikationen nach der Operation auf.

Die operierten Tiere bekamen subcutane Depots von physiologischer Kochsalz- und Glucoselösung. Ab 2. Tag wurden die Tiere durch eine Magensonde gefüttert. Der Futterbrei wurde durch Zerreiben von Altromin-R im Mörser, Sieben des Pulvers und Zusatz von Wasser und Maizöl (auf 8 g Pulver ca 1 ml Öl) hergestellt. Vor der Fütterung wurde dem Brei eine ausreichende Menge Pankreasferment (Pankreon, Fa. Kali Chemie, Hannover) zugesetzt. Gegen die Wundinfektion wie auch gegen Barthonellenanfälligkeit (Milzexstirpation) bekamen die Tiere Penicillin und Aureomycin. Die Insulinbehandlung erwies sich als äußerst schwierig, da wegen der gestörten Resorption leicht Hypoglykämien auftraten. Zweimal täglich bekamen die Tiere 1 Stunde nach der Fütterung mit einem subcutanen Glucosedepot 0,5-2 IE Altinsulin (je nach Blutzuckerhöhe).

Als Todesursachen, die direkt durch die Operation auftraten, wurden festgestellt: gallige Peritonitis, Verschlußikterus und hämorrhagischer Darminfarkt. Im postoperativen Stadium waren neben Coma hypoglykemicum und Kreislaufversagen das akute Nierenversagen häufigste Todesursache. Das akute Nierenversagen, zu erklären aus der langen Operationsdauer und Blutverlusten mit Minderdurchblutung der Nieren (Schockniere), äußerte sich in Oligurie, schließlich Anurie und Coma urämicum.

In Anbetracht der großen Schwierigkeiten wurde auf die Pankreatektomie als Routineverfahren der Erzeugung eines akuten Diabetes verzichtet und die Methode des insulinopriven Alloxandabetes (vgl. Methodik) vorgezogen.

Statistische Berechnung

Die Standardabweichung s wurde unter Zugrundelegung der Streuung s^2 errechnet. Dabei ist

$$s^2 = \frac{S(x^2) - \bar{X}S(x)}{N - 1}$$

$S(x^2)$ = Summe der ins Quadrat erhobenen Einzelwerte

$$s = \sqrt{s^2}$$

$\bar{X}$ = Arithmetischer Mittelwert

$S(x)$ = Summe der Einzelwerte

N = Anzahl der Einzelwerte

Die statistische Berechnung der Signifikanzschränken erfolgte nach der Student-Verteilung t . Diese wird mit Hilfe der Standardabweichung der Mittelwertdifferenz zweier Reihen errechnet:

$$s^2_{x,x'} = \frac{S(x^2) - \bar{X}S(x) + S(x'^2) - \bar{X}'S(x')}{N + N' - 2}$$

$$s_D = \sqrt{\frac{s^2_{x,x'}}{N} + \frac{s^2_{x,x'}}{N'}}$$

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{X}'}{s_D}$$

Die Wahrscheinlichkeit P wurde den "Wissenschaftlichen Tabellen Geigy" 6.Auflage, 1960, Seite 32, entnommen.

Zusammenfassung

1. Bei Versuchen, Isocitrat in der Rattenleber zu bestimmen, zeigte sich, daß der Gehalt zu gering ist, um mit den üblichen Methoden exakt erfaßt zu werden. Es wurde daher eine hochempfindliche und spezifische Methode zur Bestimmung von Isocitrat entwickelt.
2. In der normalen Rattenleber fand sich ein mittlerer Isocitratgehalt von 8,4 nM/g Frischleber. Der durchschnittliche Citratgehalt beträgt 162 nM/g Frischleber. Die Verteilung von Citrat und Isocitrat in der Leber entspricht demnach etwa dem durch das Enzym Aconitase in vitro eingestellten Gleichgewicht (89 % Citrat, 8 % Isocitrat, Rest cis-Aconitsäure).
3. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten des Isocitrats in der Rattenleber unter verschiedenen Ketoseverhältnissen bestimmt.
 - a) Bei mäßiger Ketose (Blut-AcAc $\leftarrow$ 1 mg%) durch Langzeit-Diabetes oder durch Hunger (24 Stunden) zeigte der Isocitratgehalt der Leber keine statistisch signifikante Veränderung.
 - b) Bei starker Ketose (Mittelwerte des Blut-AcAc $\rightarrow$ 10 mg%) durch Fettfütterung war Isocitrat in der Leber um -50 % bis -75 % verringert, während es beim akuten Diabetes mit gleichzeitigen Cortisongaben nicht absank.

4. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf den Mechanismus der Ketonkörperbildung diskutiert, wobei besonders auf das diskrepante Verhalten des Isoci-
trats bei der Fettfütterungsketose und den akut
diabetischen Ketosen eingegangen wird.

Herrn Prof. Dr.O.Wieland möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die vielen Rat-schläge herzlich danken.

Dank sei auch meinen lieben Eltern für die lang-jährige finanzielle Unterstützung.

LITERATUR:

1. Adler, v.Euler und Mitarb.: Biochem. J. 33, 1028,
(1939)
2. Arai, T. and S. Masaki: Chemical Abstracts 54,
21409 e, (1960)
3. Arai, T. and H. Tagawa Acta Path. Japon. 9,
423, (1959)
4. Bachhawat, B.K., Robinson, W.G. and Coon, M.J.:
J.Americ.Chem.Soc. 76,
3098, (1954)
- 4a. Bachhawat, B.K., Robinson, W.G. and Coon, M.J.:
J.Biol.Chem. 219, 539
(1956)
5. Bachhawat, B.K., Robinson, W.G. and Coon, M.J.:
J.Biol.Chem. 216, 727
(1955)
- 5a. Bachhawat, B.K., Woessner, J.F. and Coon, M.J.:
Fed.Proc. 15, 214 (1956)
6. Barbieri, E.: Chemical Abstracts 55,
6631g (1961)
7. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R.,
Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G.:
Z.Naturforsch. 8b, 555,
(1953)
8. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymati-
schen Analyse. Weinheim,
Verlag Chemie 1962,
S.319 u.1032
9. Bierman, E.L., Doll, V.P. and Roberts, T.N.:
Diabetes 6, 475, (1957)
10. Blaylock, B.A., Rothrock, E. and Sachs, J.: Americ.J.
Physiol. 198, 1063, (1960)

11. Bloch, K., Clark, C. and Harary, J.: J.Biol.
Chem. 211, 687, (1954)
12. Vgl. Bloch, K.: Recent Progress in Hormone Research 6, 111,
(1951)
13. Bortz, W.M. und Lynen, F.: Biochem.Z. 337, 505,
(1963)
14. Bortz, W.M. und Lynen, F.: Biochem.Z. 339, 77,
(1963)
15. Boxer, G.E. and Stetten, D.: J.biol.Chem. 153,
607, (1944)
16. Brady, R.O.: Proc.nat.acad.Sci.
(Wash.) 44, 993,(1958)
17. Brady, R.O., Gurin, S.: J. biol. Chem. 199,
421, (1952)
18. Breusch, F.L.: Advanc.Enzymolog. 8,
408, (1948)
19. Buchanan, J.M. and Anfinsen, C.B.: J.biol.Chem.
180, 147, (1949)
20. Buchanan, J.M., Sakami, W., Gurin, S., Wilson,D.W.:
J.biol.Chem. 157, 747
(1945)
21. Bücher, Th. und Klingenberg, M.: Angew.Chem. 70,
552, (1958)
23. Ceithaml, J. and Vemesland, B.: J.biol.Chem. 178,
133, (1949)
24. Chen, R.F. and Plaut, G.W.E.: Fed.Proc. 21, 244,
(1962)
25. Ciotti, M.M. und Kaplan, N.O. in: Methods in En-
zymology, Academic Press,
New York 1957,Bd.3,S.890
26. Coon, M.J. und Mitarb.: Fed.Proc. 14, 762,(1955)

27. Coon, M.J.: J.Am.Chem.Soc. 79, 1505,
(1957)
28. Copenhaver, J.H., Shipley, E.G. and Meyer, R.K.:
Arch.Biochem. 34, 360,
(1951)
29. Ditary, F., Shaw, W.N., Warms, G. and Gurin, S.:
J.biol.Chem. 226, 407,
(1957)
30. D'onofrio and Testa, M.: Chemical Abstracts 55,
5726b, (1961)
31. Drury, D.R.: Americ.J.Physiol. 131,
536, (1940-41)
32. Eisenstein, A.B.: Biochim. et Biophys.
Acta 36, 580, (1959)
33. Ellwood, J.C. and van Bruggen, J.T.: J.Biol.Chem.
235, 568, (1960)
34. Ellwood, J.C., Marco, A. and van Bruggen, J.T.:
J.Biol.Chem. 235, 573,
(1960)
35. Felts, J.M. Chaikoff, J.L. and Osborn, M.J.:
J.biol.Chem.191, 683,
(1951)
36. Felts, J.M., Chaikoff, J.L. and Osborn, M.J.:
J.biol.Chem. 193, 557
(1951)
- 36a. Felts, P.: Persönliche Mitteilungen
37. Ferguson, J.J.jr., Durr, J.F. and Rudney, H.:
Proc.nat.academ.Sci.
(Wash.) 45, 499, (1959)
38. Fildes, P.: Lancet 1, 955, (1940)
39. Fitch, W.M. and Chaikoff, J.L.: Biochim. et Biophys.
Acta 57, 588, (1961)

40. Fitch. W.M. and Chaikoff, J.L.: Biochim. et
Biophys. Acta 57, 588,
(1962)
41. Flaschenträger, B. und E. Lehnartz: Physiolog. Che-
mie 2a, S.828, Berlin, Göt-
tingen, Heidelberg: Sprin-
ger (1954)
42. Frank, H. und Kirchberger, E.: Bioch.Z. 320, 359,
(1950); vgl. Anleitung für
das Photometer
43. Freedman, A.D. and A.M. Nemeth: J.biol.Chem. 236,
3083, (1961)
44. Frohmann, C.E. and J.H. Orten: J.biol.Chem. 216,
795, (1955)
45. Frohmann, C.E. and J.H. Orten: J.biol.Chem. 205,
721, (1953)
46. Ganguly, J.: Biochim. Biophys. Acta
40, 110, (1960)
47. Gavosto, F. and A. Pileri: Chem.Abstr. 55, 15691,
(1961)
48. Goebell, H. and Klingenberg, M.: Biochem. et Bio-
phys.Res.Comm. Vol.13,
Nr. 3, (1963)
50. Gordon, R.S.jr. and Cherkas, A.J.: J.Clin.Invest.
35, 206, (1956)
51. Gordon, R.S.jr.: J.Clin.Invest. 36, 810,
(1957)
52. Gutfeund, H., Ebener, K.E. and L. Mendiola:
Nature 192, 820, (1961)
53. Hall, J.C., L.A. Sordahl and P.L.Stefko: J.Biol.
Chem. 235, 1536, (1960)

54. Hathaway, J.A. and D.E. Atkinson: J.Biol.Chem. 238, 2875, (1963)
56. Heinsen, H.A.: Klinik der Gegenwart, Handbuch der prakt. Medizin, hrsg. v. R. Cobet, K. Gutzeit u. H.E. Bock, Verlag Urban-Schwarzenberg München-Berlin, 2.Band, S.596
57. Hertelendy, F. and T.G. Taylor: Worlds Poultry Cong. Proc., 12th, Sidney, (1962)
58. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. u. Th. Bücher: Bioch.Z. 332, 18 (1959)
59. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Reim, M. und Hübener, H.J.: Biochem.Biophys.Res.Comm. 4, 163, (1961)
60. Horecker, B.C. u. P.Z. Smyrnotis in S.P. Colowick u. N.O. Kaplan: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, (1955), Bd.I, S.223, u. J.Biol.Chem. 193, 371, (1951)
61. Hotta, S. u. J.L. Chaikoff: J.biol.Chemistry 198, 895, (1952)
62. Iyer, S.Y.N., M.S.P. Nair and M. Sukumaran: Biol.J. 78, 766, (1961)
63. J. of Biol. Chem. Vol236, Nr.10, Okt.1961 (Lowry)
64. Kalnitzky, G. and Tapley, D.F.: Bioch.J. 70, 28, (1958)
65. Keilin, D. and Hartsel, E.F.: Bioch.J. 39, 293, (1945); vgl.auch: Information der Biochemica Boehringer: Enzym.Bestimmung der Glucose

66. Kirsten, E., Kirsten, R., H.J. Hohorst and Th.Bücher:
Biochem.Biophys.Res.Comm.
4, 169, (1961)
67. Klebanoff, F.J. and A.L. Greenbaum: J.Endocrin. 11,
314, (1954)
68. Knappe, J., Ringelmann, E. u. Lynen, F.: Biochem.Z.
335, 168, (1961)
69. Knappe, J., Schlegel, H.G. u. Lynen, F.: Biochem.Z.
335, 101, (1961)
70. Knappe, J., Ringelmann, E. u. Lynen, F.: Biochem.Z.
332, 195, (1959)
71. Kornberg u. Pricer: J.biol.Chem. 189, 123, (1951)
72. Kraemer, K. and Krah1, M.E.: Fed.Proc.20, 193, (1961)
- 72a. Green, M. and L.L. Miller: Chem.Abstr. 55, (1961),
5623 f
73. Krebs, H.A. and Johnson, W.A.: Adv. Enzymology 3,
191, (1943)
74. Krebs, H.A. and Johnson, W.A.: Enzymologia 4, 148,
(1947)
75. Krebs, H.A.: Harvey Lect., S.165 (1948-
49)
76. Kronfeld, D.S.: Vet.Research 22, 496,(1961)
s.auch Chem.Abstr. 55,20165b
77. Kubena, K., Dvorak, V. and Kubicek, R.: Chem.Abstr.
59, 14424g, (1963)
78. Langdon, R.G.: J.biol.Chem. 226, 615,(1957)
79. Langdon, R.G.: In Lipid Metabolism, p.238
edit.Bloch,K., New York:
John Wiley and Sons Inc.
80. Laurell, S.: Scand.J.Clin.Lab.Invest. 8,
81, (1956)

81. Lehninger, A.L.: J.biol.Chem.164,291, (1946)
82. Leuthart, F.: Lehrbuch der Physiol.Chemie
S.36. Berlin: Walter de
Gruyter, (1959)
- 82a. Lindner, A. und B. Rudas: Naunyn - Schmiederbergs
Arch.exp.Path.u.Pharmak.
247, (1964), 110
83. Lipmann, F.: J.Biol.Chem. 160,173, (1945)
84. Löffler, G.: Dissertation, Universität
München, (1961)
- 84a. Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Schulz, D.W. and
Rock, M.K.: J.biol.Chem. 236,2746 (1961)
85. Lynen, F.: Liebigs Ann. 552, 270,(1942)
86. Lynen, F. Reichert, E. u. Rueff, L.: Liebigs Ann.
578, 1, (1951)
87. Lynen, F., Wessely, L., Wieland, O. u. Rueff, L.:
Angew.Chem. 64, 687, (1952)
88. Lynen, F., Henning, U., Bublitz, C. Sörbo, B. und
Kröplin-Rueff, L.: Biochem.Z. 330, 269, (1958)
89. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jütting, G.,
Ringelmann, E. u. Lachance, J.P. Biochem.Z. 335,
123, (1961)
90. Lynen, F.: Angew.Chem. 164, 291,(1946)
91. Lynen, F.: J.cell.comp.Physiol. 54,
Suppl. 1, 33, (1959)
92. Lynen, F., M.Matsushashi, S.Numa and E.Schweizer:
Biochemica Society Symposia.
Edit. by J.K. Grant, 1963,
Academic Press New York and
London, Nr.24. The Controll
of Lipid Metabolism, § 53

93. Martius u. Knoop: Z.Physiol.Chem. 242, I
(1936)
94. Martius, C. u. Leonhardt, H.: Z.Physiol.Chem. 278,
208, (1943)
95. Meister, A.: Science 120, 43, (1954)
- 95a. Meister, A.: Biochemistry of the amino
acids, Academic Press, New
York 1957, S.149
96. Menon, K. and J. Segal: J.biol.Chem. 236, 2872,
(1961)
97. Methods in Enzymology I, Tabelle, S.76.
98. Methods in Enzymology, hrsg.v. S.P. Colowick and
M.O. Kaplan. Acad.Press Inc.
New York 1957, Vol.III,S.426
99. Miura, K. and Uchiyama, T.: Chem.Abstr. 55, 10631 g
(1961)
100. Moyle u. Dixon: Biochem.J. 63, 548, 552,
(1956)
101. Nachmansohn, D.: J.Neurophysiol. 6, 397,
(1943)
102. Nachmansohn, D. u. Berman, M.: J.Biol.Chem. 165, 551,
(1946)
103. Natelson, J.B. Purcus and J.U. Lugovoy:
J.biol.Chem. 175, 745,(1948)
104. Netheler u. Hinz: Klinisch-chemische Unter-
suchungsmethoden mit dem
Photometer Eppendorf, GMBH
Hamburg
106. Numa, S., Matsuhashi, M. u. F. Lynen: Biochem.Z.
334, 203, (1961)
- 106a. Numa, S.: Persönliche Mitteilung

107. Ochoa, S. u.Mitarb.: J.Biol.Chem. 192,703,(1951)
108. Ochoa, S.: J.Biol.Chem. 174,133,(1948)
- 108a. Odahara, H.: Chem.Abstr.55, (1961) 1893d
109. Oji, N., Moriwaki, T. Shigata, Y. and M. Wada:
Chem.Abstr. 55, 20217d,
(1961)
110. Pagliaro, L. and Notarbattolo: Chem.Abstr. 55, 27626h,
(1961)
111. Penttilä, J.Maud, Pöllänen, L.O.: Chem.Abstr. 55,
7661g, (1961)
112. Plaut u. Sung: J.biol.Chem., 207, 305,
(1954)
113. Plaut, G.W.E. and Chen, R.F.: Fed.Proc.21,244,(1962)
114. Potter, V.R.: Methods in Enzymology I,
S.10, New York, Acad.Press
(1955)
115. Potter u. Heidelberger: Nature 164, 180, (1949)
116. Puchol, J.R. and C. Carballido: Med.Exptl. 1, 305,
(1959)
117. Puchol, J.R. and Carballido, A.: Med.Exptl. 5, 1,
(1961); s.auch: Chem.Abstr.
56, 10820b, (1962)
118. Quastel: Bioch.J. 32, 243, (1938)
119. Rechenberger, J. u. Berndorf, S.: Z.f.klin.Med. 154,
648, (1957)
120. Rembiesa, R.: Pathologia Polska, 10,
431, (1959)
121. Rittenberg, D. u. Bioch, K.: J.Biol.Chem. 157, 749
(1945)
122. Rosen, F. Roberts, N.R., Budnick, L.E. and Nichol,C.A:
Endocrinology 65,256,(1959)

- 122a. Rudas, B. und W.Weissel: Wiener Klinische Wochenschrift 47, (1963), 846
123. Schmidt, H., K. Goeth, I. Hallmann u. C.v.Holt: Biochem.Z. 334, 534, (1961)
124. Schrade, W., Böhle, E., Biegler, R. und Kirst, H.: Münchn.Med.Wschr. 101, 2062, (1959)
- 124a. Scow, R.O.: Endocrinology 60, 359, (1956)
125. Seubert, W., Greull, G. und Lynen, F.: Angew.Chem. 69, 359, (1957)
126. Shaw, V.W. and Tapley, D.F.: Biochem.Biophys.Acta 30, 426, (1958)
127. Stern, J.R., Ochoa, S. und Lynen, F.: J.biol.Chem. 198, 313, (1952)
129. Tenconi, L.T.: Chem.Abstr. 55, 4756i, (1961)
130. Tombropoulos, E.G. and Kleiber, M.: Biochem.J. 80, 414, (1961)
131. Tubbs, P.K.: Biochem.Biophys.Acta 70, 608, (1963)
- 131a. Tubbs, P.K. and P.B. Farland: Biochem.J. 89, 25p, (1963)
- 131b. Wagle, S.R., Fifth Congress of the International Diabetes Federation, Toronto, Canada, July 20-24, 1964
132. Wakil, S.J., Titchener, E.B. and Gibson, D.M.: Biochim.Biophys.Acta 29, 225, (1958)
133. Wakil, S.J.: J.Americ.chem.Soc. 80, 6465, (1958)
134. Walker, P.G.: Biochem.J. 58, 699, (1954)

135. Warburg, O.: Enzymforsch. 7, 210, (1958)
136. Weinhouse, S., Medes, G. and Filoyd, N.F.: J.Biol. Chem. 158, 411, (1945)
137. Weinhouse, S., Medes, G. Gloyd, N.F. and Noda, N.: J.Biol.Chem. 161, 745, (1945)
138. Weiß, L.: Disseration, Universität München, (1963)
139. Welch, A.D.: Physiol.Rev. 25, 687, (1945)
140. Wieland, H.: Ergebn.d.Physiol. XX, 477, (1922)
141. Wierand, O.: Klin.Wschr. 32, 385, (1954)
142. Wieland, O. u. Löffler, G.: Bioch.Z. 339, 204, (1963)
143. Wierand, O.: 8.Kolloquium der Gesellschaft für physiol.Chemie, Moosbach, Baden, (1957)
144. Wieland, O.: Vortrag in Beirut, 3.5.1963
145. Wieland, O.: 4.Congr.Féder.intern.du Diabète, Genf, Juli 1961, Verh.Bd.1, S.131, Edition Médecine et Hygiène, Genf 1961
146. Wieland, O.; F. Matchinsky, G. Löffler u. U. Müller: Biochim.Biophys.Acta 53, 412, (1961)
147. Wieland, O. and Weiß, L.: Biochem.biophys.Res.Comm. 4, 333, (1963)
148. Wieland, O., G. Löffler, L. Weiß u. I. Neufeldt: Biochem.Z. 333, 10, (1960)
149. Wieland, O. u. L. Weiß: Biochem.Biophys.Res.Comm. 13, 26, (1963)

150. Wieland, O. u. L. Weiß: Tg.Dtsch.Ges.Physiol.Chem.
Straßburg, 18.-21.9.1963
151. Wieland, O., L. Weiß u. I. Eger-Neufeldt: Bioch.Z.
339, 501 (1964)
152. Wieland, O. u. I. Neufeldt: Zeitschr.f.physio.Chem.
324, 101, (1961)
153. Wieland, O., I. Neufeldt-Eger, Numa, S. u. Lynen, F.:
Biochem.Z. 336, 455, (1963)
154. Wollenberger, A., E.G. Krause und B.E. Wahler:
Naturwissenschaften 45,
294, (1958)
155. Younathan, E.S.: J.Biol.Chem. 237, 608,
(1962)

Lebenslauf.

Am 20. Februar 1938 wurde ich, Karl-Adolf Wittich, als Sohn des Internisten Dr. med. Adolf Wittich und seiner Ehefrau Hanna, geb. Henkel, in Merzig (Saarland) geboren. 1945 kamen wir nach Nordhessen, wo ich in Malsfeld bis 1949 die Volksschule besuchte. Anschließend trat ich in das Realgymnasium in Melsungen ein; hier legte ich 1958 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1958 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Göttingen. Nach dem Wintersemester 1958/59 legte ich an der Justus-Liebig-Universität in Gießen das Vorphysikum und im Sommer 1960 die ärztliche Vorprüfung ab. Das klinische Studium begann ich an der Universität München. 1962 heiratete ich meine Frau Christine, geb. Catrein. Im Herbst 1963 bestand ich in München das medizinische Staatsexamen.

Anschließend arbeitete ich als Medizinalassistent in der Privatklinik meines Vaters in Melsungen und danach auf der chirurgischen Abteilung der Decker-Klinik in München. Seit November 1964 bin ich an der I. Frauenklinik der Universität München beschäftigt. Die vorliegende Dissertationsarbeit entstand in den Jahren 1961 bis 1963.

